



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**PARTICIPACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO INDEPENDIENTES DE NOX 2 EN LA  
NETOSIS INDUCIDA POR *Entamoeba histolytica***

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**M. EN C. CÉSAR DÍAZ GODÍNEZ**

**TUTOR PRINCIPAL**  
**DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**  
**DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**  
**DR. WILHELM LUDWIG HANSBERG Y TORRES**  
**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

**CIUDAD DE MÉXICO. OCTUBRE, 2023.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunoparasitología del departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; bajo la dirección del Dr. Julio César Carrero Sánchez y el Dr. Carlos Rosales Ledezma y el Dr. Wilhelm Ludwig Hansberg y Torres como parte del comité titorial. Este trabajo fue desarrollado con el apoyo de los proyectos CONACyT 167788 y DGAPA IN206316.

## AGRADECIMIENTOS

*Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, por aceptarme y permitirme realizar este proyecto.*

*A mi futuro esposo Alan Javier Montoya Hernández, por su acompañamiento durante todo este tiempo y su apoyo incondicional, por estar conmigo en cada paso. Le agradezco su infinita paciencia y su comprensión cada vez que me vio trabajando en este proyecto. Por escucharme siempre que lo necesitaba (a pesar de no entender muchas cosas que le decía sobre la tesis). Por festejarme cada uno de los pequeños logros. Por su gran amor.*

*A mi tutor de tesis, el Dr. Julio César Carrero Sánchez, por apoyarme siempre, no solo en el laboratorio, sino fuera de él. Por ser un gran amigo durante este tiempo que estuve en su laboratorio. Por la gran confianza que depositó en mí durante estos años. Por impulsarme siempre a dar más de mí y no darme por vencido. Por siempre tener un espacio para platicar.*

*A mis padres Julia Godínez Hernández y Abraham Díaz Baleón, por motivarme siempre a perseguir mis sueños, por estar siempre cuidándome en cada paso. Por su infinita sabiduría en cada consejo dado. Por su cariño incondicional.*

*A mi comité tutor integrado por el Dr. Wilhelm Ludwig Hansberg y Torres y el Dr. Carlos Rosales Ledezma, por todos sus comentarios, recomendaciones y regaños durante este periodo que permitieron sacar este proyecto adelante.*

*A mis hermanos Angel Gael Solares Díaz y Berenice Maribel Díaz Godínez, por todas las sonrisas que me ayudaron a no rendirme.*

*A la M. en C. Patricia de la Torre y la Dra. Diana Ríos por su acompañamiento en el laboratorio, por ser unas grandes amigas y colegas. Por hacer un gran ambiente de trabajo en el laboratorio. Por cada recomendación y por cada risa.*

*Al Dr. Juan Pedro Laclette y al Dr. Raúl Bobes, por permitirme colaborar con ellos dentro del laboratorio. Por sus consejos durante los seminarios y por su apoyo experimental.*

*Al QFBT Fabián y al Biol. Samuel, dos grandes amigos y colegas. Sigán esforzándose en alcanzar sus metas y siempre contarán conmigo para apoyarlos.*

*Y finalmente al Dr. Omar Rafael Alemán, mi maestro jedi, porque muchas técnicas que me enseñó permitieron que este trabajo culminara. Gracias por siempre compita.*

## ÍNDICE

I	Índice de figuras	<a href="#">I</a>
II	Resumen	<a href="#">II</a>
III	Abstract	<a href="#">III</a>
1.	Introducción	<a href="#">1</a>
2.	Antecedentes	<a href="#">17</a>
3.	Justificación	<a href="#">18</a>
4.	Hipótesis	<a href="#">19</a>
5.	Objetivos	<a href="#">19</a>
6.	Materiales y métodos	<a href="#">20</a>
6.1	Diagrama general de trabajo	<a href="#">20</a>
6.2	Trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	<a href="#">20</a>
6.3	Purificación de neutrófilos	<a href="#">21</a>
6.4	Cuantificación de las NET inducidas con trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	<a href="#">22</a>
6.5	Tratamiento de los neutrófilos con los inhibidores	<a href="#">22</a>
6.6	Inmunofluorescencia de las NET	<a href="#">23</a>
6.7	Cuantificación de ROS intracelulares en los neutrófilos	<a href="#">24</a>
6.8	Cuantificación de ROS mitocondriales en los neutrófilos	<a href="#">24</a>
6.9	Cuantificación de ROS en los trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	<a href="#">25</a>
6.10	Reducción de las ROS en los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> y su efecto en la NETosis	<a href="#">25</a>
6.11	Detección de la actividad de MPO	<a href="#">26</a>
6.12	Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares de <i>E. histolytica</i>	<a href="#">26</a>
6.13	Microscopía electrónica de transmisión de las EV	<a href="#">27</a>
6.14	Tinción de lípidos de las EV y su interacción con los neutrófilos	<a href="#">27</a>
6.15	Transferencia de ROS mediada por EV	<a href="#">28</a>
6.16	Análisis estadístico	<a href="#">28</a>

7.	Resultados	<a href="#">28</a>
7.1	Los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> inducen NETosis de una forma dosis dependiente	<a href="#">28</a>
7.2	La NETosis inducida por <i>E. histolytica</i> parece ocurrir de forma independiente de las ROS generadas por NOX2	<a href="#">32</a>
7.3	Los trofozoítos muertos no inducen la liberación de NET y contienen una escasa cantidad de ROS	<a href="#">34</a>
7.4	El pirocatecol reduce las ROS generadas por los trofozoítos viables	<a href="#">35</a>
7.5	Los trofozoítos con bajos niveles de ROS inducen una menor liberación de NET	<a href="#">37</a>
7.6	Se detecta actividad de MPO durante la interacción neutrófilo-trofozoíto	<a href="#">39</a>
7.7	La actividad de MPO es necesaria para la NETosis inducida por <i>E. histolytica</i>	<a href="#">40</a>
7.8	La MPO se detecta en la superficie de los trofozoítos después de la interacción temprana con los neutrófilos	<a href="#">43</a>
7.9	La inhibición de la actividad de MPO extracelular reduce la NETosis inducida por los trofozoítos	<a href="#">44</a>
7.10	Las ROS de origen mitocondrial no participan en la NETosis inducida por <i>E. histolytica</i>	<a href="#">45</a>
7.11	Las EV de los trofozoítos transportan ROS hacia los neutrófilos humanos	<a href="#">48</a>
8.	Discusión	<a href="#">50</a>
9.	Conclusión	<a href="#">57</a>
10.	Perspectivas	<a href="#">58</a>
11.	Referencias	<a href="#">59</a>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Granulopoyesis y producción de proteínas granulares	<a href="#">2</a>
Figura 2	Estrategias antimicrobianas usadas por el neutrófilo	<a href="#">3</a>
Figura 3	Estructura de las NET	<a href="#">5</a>
Figura 4	Fuentes de ROS involucradas en el proceso de NETosis	<a href="#">11</a>
Figura 5	Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	<a href="#">13</a>
Figura 6	Diagrama general de trabajo	<a href="#">20</a>
Figura 7	<i>E. histolytica</i> induce NETosis en neutrófilos humanos de una forma dosis dependiente	<a href="#">31</a>
Figura 8	La NETosis inducida por los trofozoítos parece ocurrir de forma independiente de NOX2	<a href="#">33</a>
Figura 9	Los trofozoítos muertos de <i>E. histolytica</i> no inducen NETosis y contienen menos ROS	<a href="#">34</a>
Figura 10	El pirocatecol reduce las ROS generadas por los trofozoítos viables de <i>E. histolytica</i>	<a href="#">36</a>
Figura 11	Los trofozoítos reducidos en ROS inducen una menor liberación de NET	<a href="#">38</a>
Figura 12	Determinación de actividad de MPO durante la interacción de los neutrófilos con los trofozoítos	<a href="#">40</a>
Figura 13	La actividad de MPO se requiere para la NETosis inducida por los trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	<a href="#">42</a>
Figura 14	La MPO es transferida rápidamente desde los neutrófilos hacia los trofozoítos	<a href="#">44</a>
Figura 15	La actividad de MPO es requerida para la NETosis inducida por los trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	<a href="#">45</a>
Figura 16	Las ROS mitocondriales no son necesarias para la NETosis inducida por <i>E. histolytica</i>	<a href="#">47</a>
Figura 17	Las EV producidas por los trofozoítos de <i>E. histolytica</i> transportan ROS hacia los neutrófilos	<a href="#">50</a>

## RESUMEN

La NETosis es una modalidad de muerte celular programada llevada a cabo por los neutrófilos, la cual involucra una serie de pasos secuenciales, desde la detección del patógeno hasta la liberación de DNA cargado de proteínas antimicrobianas que atrapa a los microorganismos y los mata. El componente más importante en la vía de señalización celular que lleva a la NETosis es la generación central de especies reactivas de oxígenos (ROS), independientes o dependientes de la NADPH oxidasa (NOX2). Previamente, nuestro grupo de laboratorio reportó que la NETosis en neutrófilos humanos inducida por el parásito protozoario intestinal *Entamoeba histolytica*, agente causal de la amibiasis, es independiente de la generación de especies reactivas de oxígeno provenientes de NOX2, pero es dependiente de la viabilidad de los trofozoítos. Ya que las ROS son necesarias para la NETosis, en este trabajo se exploró la posibilidad de que éstas provengan de los propios trofozoítos de *E. histolytica*. La cuantificación de NET se realizó mediante el uso del colorante fluorescente de DNA SYTOX® Green en presencia de diversos inhibidores y pepenadores selectivos de ROS. Se encontró que la ausencia de ROS en los neutrófilos durante la NETosis inducida por los trofozoítos, se debe al hecho de que los trofozoítos de *E. histolytica* inhiben activamente el estallido respiratorio en los neutrófilos de una manera dosis-dependiente, bloqueando la producción de ROS a partir de proporciones de trofozoítos mayores a 1:50 (trofozoíto:neutrófilo), sin que esto afectara la NETosis. Las ROS mitocondriales tampoco fueron necesarias, ya que el pepenador mitocondrial mitoTEMPO no afectó el proceso. Sorprendentemente, los trofozoítos mostraron abundante producción basal de ROS, y trofozoítos deficientes en ROS obtenidas mediante pretratamiento con pirocatecol, mostraron menor capacidad de activar la NETosis. Al evaluar la interacción temprana entre el trofozoíto y el neutrófilo, se detectó la presencia de mieloperoxidasa (MPO) en la superficie celular de los trofozoítos a tan solo 5 minutos después de la interacción con los neutrófilos y, además, se encontró que el luminol y el isoluminol (pepenador intracelular y extracelular de ROS derivados de MPO, respectivamente) redujeron la cantidad de NET desencadenada por los trofozoítos. Estos datos sugirieron que las ROS generadas por los trofozoítos podrían liberarse al medio extracelular y procesarse por la MPO presente en su superficie durante el contacto con los neutrófilos, transfiriendo el producto al interior de los neutrófilos, donde son necesarias para que la NETosis ocurra. Con la finalidad de determinar cómo se transfieren las ROS del trofozoíto al neutrófilo, se evaluó la capacidad de los trofozoítos de liberar vesículas extracelulares (EV) que contengan ROS. Mediante el uso del Nanosight, se demostró que los trofozoítos liberan EV de diferente tamaño, incluyendo vesículas del tamaño de exosomas, las cuales transportan ROS. Finalmente, la incorporación de EV del trofozoíto conteniendo ROS al interior de los neutrófilos humanos se demostró por microscopía confocal.

## ABSTRACT

NETosis is a type of programmed cell death that takes place in neutrophils, it is realized through sequential steps, since pathogen detection till DNA release. Reactive oxygen species (ROS) are essential for NETosis signaling pathway and they are generated dependent or independent from NADPH oxidase. Previously, our working group reported that NETosis induced by *Entamoeba histolytica* (causal agent of amoebiasis) occurred independently of ROS from NOX2, nevertheless, it depends on trophozoite viability. Due to ROS are necessary for NETosis, in this work it was explored the possibility that trophozoites were the ROS source involved in the process. NETs were quantified using DNA fluorescence stain SYTOX® Green in the presence of inhibitors or ROS scavengers. It was found that *E. histolytica* trophozoites suppressed the respiratory burst into neutrophils in a dose-dependent manner (this phenomenon was observed from a ratio of 1:50). Mitochondrial ROS were not necessary either because the mitoTEMPO scavenger did not affect the process. Surprisingly, amoebas showed abundant basal ROS production, and ROS-deficient amoebas obtained by pretreatment with pyrocatechol showed less ability to induce NETosis. Evaluating the early interaction between amoeba and neutrophils, the presence of MPO was detected on the cell surface of trophozoites as early as 5 minutes after interaction with neutrophils, and luminol and isoluminol, (intracellular and extracellular MPO-derived ROS scavengers, respectively) reduced the NETs amount triggered by amoebas. These data suggested that ROS generated by trophozoites could be released into the extracellular medium and processed by MPO present on their surface, transferring the product into neutrophils, where they are required for trophozoite-induced NETosis. To determine how ROS are transferred from the amoeba to neutrophil, the ability of amoebas to release ROS-containing extracellular vesicles (EVs) was evaluated. Using Nanosight, it was shown that amoebas release EVs of different sizes, including exosome-sized vesicles, which carry ROS. Finally, the incorporation of ROS-containing amoeba EV into human neutrophils was demonstrated by confocal microscopy.

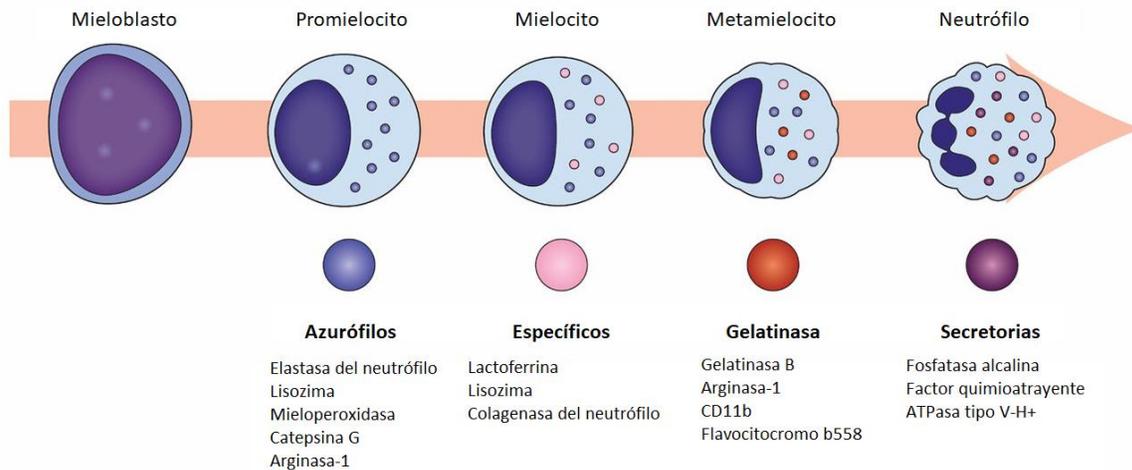
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades del Neutrófilo

Los neutrófilos pertenecen al grupo de los leucocitos polimorfonucleares y son los glóbulos blancos más abundantes en la sangre periférica de los mamíferos. La producción de neutrófilos es de  $10^{11}$  células al día aproximadamente y cuentan con una vida media corta estimada en 6-8 h dentro de la circulación, sin embargo, su producción puede aumentar hasta en 10 veces más y su vida puede extenderse hasta en 7 días cuando hay una respuesta inflamatoria (Rosales, 2018; Lawrence-Burn et al., 2021). Pertenecen al grupo de los leucocitos polimorfonucleares junto con los basófilos y eosinófilos, esto debido a las múltiples lobulaciones (3-4) que presenta su núcleo.

Los neutrófilos se producen en la médula ósea a partir de las células troncales hematopoyéticas en un proceso conocido como granulopoyesis o neutropoyesis (Malengier-Devlies et al., 2021) en el que se generan una serie de precursores: progenitor de macrófagos y neutrófilos, mieloblasto, promielocito, mielocito, metamielocito, neutrófilo en banda y neutrófilo segmentado (Lawrence et al., 2018). Este proceso dura poco más de 10 días y se regulan mediante la presencia de citocinas y factores de crecimiento como la interleucina 3 (IL-3), el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) (Fiedler y Brunner, 2012). Un punto clave de este proceso de maduración es la producción de diferentes gránulos citoplasmáticos que le permitirán a este leucocito cumplir con sus funciones inmunitarias al alcanzar su estadio final (Figura 1). Los gránulos azurófilos son los primeros en producirse y se caracterizan por su contenido rico en enzimas antimicrobianas como la elastasa del neutrófilo (NE), lisozima (LIZ), mieloperoxidasa (MPO), catepsina G (CG) y arginasa-1. Los gránulos específicos se producen en segundo lugar y contienen lactoferrina, LIZ y colagenasa del neutrófilo (MMP8). Posteriormente inicia la producción de los gránulos de gelatinasa en los que se encuentra la gelatinasa B, arginasa-1, CD11b y el flavocitocromo b558. Finalmente, se producen las vesículas secretorias las cuales

contienen fosfatasa alcalina, factor quimioatrayente, flavocitocromo b558 y ATPasa tipo V-H<sup>+</sup>) (Lawrence et al., 2018).



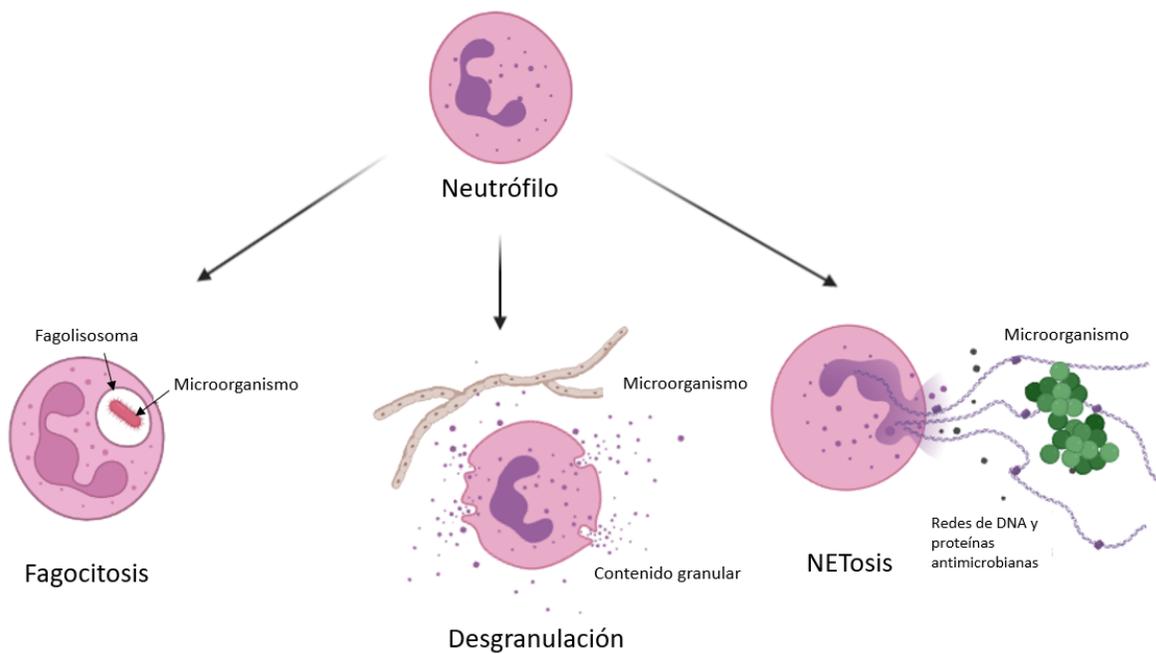
**Figura 1. Granulopoyesis y producción de proteínas granulares.** El proceso de maduración de los neutrófilos se caracteriza por la aparición secuencial de diferentes tipos de gránulos citoplasmáticos, los cuales difieren en su contenido. Los gránulos presentes en un neutrófilo maduro con azurófilos, específicos, gelatinasa y vesículas secretorias. Imagen tomada y modificada de Lawrence et al. (2018).

## 1.2 Papel del neutrófilo en la defensa del huésped

Los neutrófilos representan la primera línea de defensa por parte de la inmunidad innata y acuden rápidamente a los sitios de daño y de entrada de microorganismos (Mantovani et al., 2011).

Para cumplir sus funciones defensivas, los neutrófilos poseen diferentes estrategias para combatir y eliminar microorganismos (Figura 2). Son capaces de liberar sustancias reguladoras del proceso inflamatorio como quimiocinas, particularmente de la familia CXCL; citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-7 o IL-16, o bien, citocinas antiinflamatorias como la IL-1ra, el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) y TGF- $\beta$ 2 (Tecchio et al., 2014). También realizan el proceso de fagocitosis para engullir partículas y degradarlas en su interior mediante mecanismos no oxidativos (enzimas antimicrobianas) y mecanismos oxidativos asociados a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Pueden fagocitar partículas opsonizadas y no opsonizadas por la presencia de receptores

tipo dectina (dectina-1), el receptor para la fracción 3b del complemento (RC3b) y receptores para inmunoglobulinas G (RFc- $\gamma$ ) (Lee et al., 2003). Estos leucocitos también pueden liberar el contenido de sus gránulos citoplasmáticos mediante exocitosis en un proceso denominado como desgranulación llevando al espacio extracelular enzimas como NE, MPO, catepsina G y péptidos antimicrobianos como defensinas (Lacy, 2006). Estos procesos son importantes para mantener la homeostasis del huésped y aunque no son excluyentes, su ocurrencia temporal es distinta, siendo la fagocitosis el arma de primera línea y la desgranulación llevándose a cabo después. Finalmente, los neutrófilos pueden liberar redes constituidas de DNA y proteínas antimicrobianas denominadas como NET, las cuales pueden atrapar e incluso matar microorganismos (Brinkmann et al., 2004). La estructura y composición de las NET se explorará como mayor profundidad a continuación.



**Figura 2. Estrategias antimicrobianas usadas por el neutrófilo.** El neutrófilo puede engullir microorganismos y atraparlos en cuerpos membranosos llamados fagosomas los cuales se fusionan con los gránulos citoplasmáticos dando origen al fagolisosoma; posteriormente se degradan por mecanismos oxidativos y no oxidativos. En otros casos pueden liberar por exocitosis el contenido de sus gránulos hacia el espacio extracelular en un mecanismo llamado desgranulación. Finalmente, bajo ciertas circunstancias el neutrófilo puede liberar su DNA recubierto con proteínas antimicrobianas para atrapar y eliminar microorganismos.

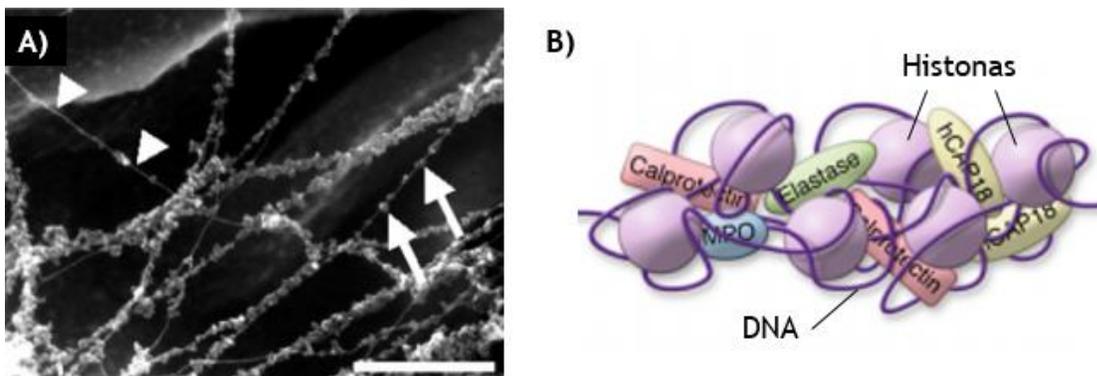
### 1.3 Trampas extracelulares del neutrófilo

Desde 1980 se ha descrito que los neutrófilos activados con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato, mejor conocido como PMA (un agente mitógeno) experimentan una muerte celular, además, estas células poseen actividad tóxica, causando la muerte de células cancerosas (linfoblastos formadores de tumor) y la lisis de glóbulos rojos en un mecanismo dependiente de la formación de ROS (Tsan, 1980; Dallegri et al., 1983; Dallegri et al., 1985). Pasaron 24 años hasta que Brinkmann et al. (2004) describieran que el PMA y otros estímulos como la IL-8 o el lipopolisacárido (LPS) provocan un nuevo tipo de muerte en los neutrófilos caracterizada por una descondensación inicial de la cromatina, seguida de la liberación de ésta al espacio extracelular. La cromatina liberada está recubierta por proteínas provenientes de los gránulos citoplasmáticos del neutrófilo y se le dio el nombre de trampas extracelulares del neutrófilo (NET) por su capacidad de atrapar microorganismos. En este trabajo también se reporta la actividad antimicrobiana de las NET que ocasionan la muerte de las bacterias *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus* y se menciona su potencial para degradar factores de virulencia (adhesinas). El análisis ultraestructural de las NET indica que poseen diferentes niveles de organización: en primer lugar, están formadas por fibras delgadas de cromatina de un diámetro aproximado de 15 a 17 nm con dominios globulares más gruesos de 25 nm aproximadamente (Figura 3). Las fibras se agregan formando largas hebras (Brinkmann y Zychlinsky, 2012) de DNA que al encontrarse hidratadas forman estructuras similares a una nube dentro de las cuales se atrapan a los microorganismos (Stoiber et al., 2015).

Actualmente sabemos que las NET constan de cromatina decorada con enzimas y péptidos microbicidas, aunque su potencial antimicrobiano no solo está ligado a la presencia de estas moléculas; puesto que el DNA también está asociado a las histonas (H1, H2A, H2B y H3) las cuales poseen actividad antimicrobiana por sí mismas o cuando han sufrido cortes proteolíticos. Esto debido a su interacción con la membrana de los patógenos formando poros y causando un desequilibrio osmótico (similar a la acción de los péptidos antimicrobianos) (Neeli y Radic, 2012;

Li et al., 2020). También se ha demostrado que el DNA posee capacidad microbicida debido a la presencia de los grupos fosfato cargados negativamente, haciendo que el DNA se comporte como un agente quelante, secuestrando a los cationes necesarios para la sobrevivencia de los microorganismos (Halverson et al., 2015).

Se han descrito más de 330 proteínas asociadas a las NET que provienen tanto de los gránulos citoplasmáticos como del núcleo y del citoplasma, siendo de particular importancia aquellas relacionadas con funciones antimicrobianas como la NE, MPO, catepsina G, azurocidina, proteinasa 3, lisozima y catelicidinas (Petretto et al., 2019). El origen del DNA que conforma a las NET también puede variar dependiendo del estímulo que induce su liberación pudiendo provenir del núcleo en la mayoría de los casos, o pueden estar formadas por DNA mitocondrial (Yousefi et al., 2009; McIlroy et al., 2014).



**Figura 3. Estructura de las NET.** A) Microscopía electrónica de barrido de alta resolución de NETs: con cabezas de flecha se indican las fibras delgadas de DNA de aproximadamente 17 nm de diámetro y con flechas se muestran los dominios globulares de aproximadamente 50 nm de diámetro. La barra de escala equivale a 1000 nm; B) Esquema de un dominio globular de las NET en donde se muestra el DNA, histonas y las proteínas antimicrobianas asociadas. Imágenes tomadas y modificadas de Brinkmann et al. (2004) y Sørensen y Borregaard (2016).

#### 1.4 Liberación de NET y NETosis

La nomenclatura para nombrar a la liberación de DNA por parte del neutrófilo en respuesta a estímulos patológicos ha cambiado y actualmente se acepta que la formación de NET que implica la muerte del neutrófilo se denomina como NETosis (Steinberg y Grinstein, 2007). Sin embargo, cuando el neutrófilo expulsa las redes

de DNA sin comprometer su viabilidad, esta se denomina liberación de NET (Yousefi et al., 2009). Por lo tanto, el término “NETosis vital” sería contradictorio y entraría en desuso puesto que el sufijo *ptosis* se utiliza para indicar un tipo de muerte celular.

La NETosis se diferencia de la apoptosis debido a que no hay exposición de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana citoplasmática, el DNA permanece íntegro sin fragmentarse ni tampoco hay formación de cuerpos residuales, además, es un mecanismo independiente de la vía de las caspasas (Fuchs et al., 2007).

## **1.5 Mecanismo general de la NETosis**

### **1.5.1 Estímulos inductores de NETosis**

El estudio de las NET se ha realizado utilizando estímulos de poca relevancia biológica para realizar la caracterización del proceso. Entre ellos figuran el PMA y los ionóforos de calcio A23187 y ionomicina (Brinkmann et al., 2004; Douda et al., 2015). Sin embargo, se ha reportado una gran variedad de microorganismos patógenos inductores de NETosis como: bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* (Speziale y Pietrocola, 2021) y *Streptococcus pneumoniae* (Beiter et al., 2006); Gram negativas como *Shigella flexneri* (Brinkmann et al., 2004); hongos filamentosos y levaduriformes como algunas especies de *Aspergillus* (McCormick et al., 2010) y *Candida albicans* (Urban et al., 2006); protozoarios parásitos como *Leishmania amazonensis* (Guimarães-Costa et al., 2009), *Trypanosoma cruzi* (Sousa-Rocha et al., 2015) y *Toxoplasma gondii* (Abi-Abdallah et al., 2012). Se ha demostrado que algunos componentes de la cubierta de patógenos también funcionan como inductores de la formación de NETs, teniendo como ejemplo el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas (Brinkmann et al., 2004) y la lipopeptidoglicana (LPG) de *Leishmania* (Guimarães-Costa et al., 2009). De igual forma, algunos estados fisiopatológicos llevan a la formación de NET ligados a la liberación de DAMP y alarminas, tal es el caso de los pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), preeclampsia e inflamación estéril (Mutua y Gershwin, 2021).

### 1.5.2 Receptores implicados en la liberación de NETs inducida por patógenos

Actualmente, se han identificado diferentes receptores relacionados con la NETosis inducida por microorganismos patógenos. Diferentes miembros de los receptores tipo Toll (TLR) se han implicado en la liberación de NET, por ejemplo, Juneau et al. (2011) mostraron la disminución en la inducción de NET en neutrófilos deficientes de la expresión de TLR4 al estimularse con la bacteria Gram negativa *Haemophilus influenzae* (muerta por calor) al compararlo con la inducción sobre neutrófilos que expresan el TLR4 de forma normal. Cacciotto et al., (2016) describieron que *Mycoplasma agalactiae* induce NETosis a través de un mecanismo dependiente de la estimulación vía TLR2. En este sentido, la estimulación de los receptores TLR2 y TLR4 se relacionan con la NETosis inducida por diferentes patógenos como: la proteína F del virus sincicial respiratorio (Funchal et al., 2015); las hifas y conidios del hongo *Fonseca pedrosoi* (Breda et al., 2020); los tripomastigotes y el antígeno soluble de *Trypanosoma cruzi* (Sousa-Rocha et al., 2015), así como la bacteria Gram positiva *Streptococcus suis* serotipo 2 (Ma et al., 2018).

Por otro lado, los receptores tipo dectina también se relacionan con la liberación de NET, sobre todo por su importancia en la determinación del tamaño de los patógenos, lo cual puede llevar a la liberación selectiva de NET cuando el neutrófilo detecta a un patógeno de gran tamaño como bacterias agregadas o formas filamentosas de *Candida albicans* a través del receptor dectina-1 (Branzk et al., 2014). En caso de que el patógeno se detecte como “pequeño” el neutrófilo optará por la fagocitosis del microorganismo (bacterias disgregadas y formas levaduriformes). Además, los receptores para inmunoglobulinas también se han relacionado con la liberación de NET, tal es el caso del receptor FcγRIIIb cuyo entrecruzamiento lleva la NETosis de neutrófilos humanos (Alemán et al., 2016).

## 1.5.2 Participación de las ROS en la liberación de las NET

### 1.5.2.1 NETosis dependiente de NOX2

Fuchs et al. (2007) describieron por primera vez que durante la NETosis inducida con PMA en neutrófilos humanos ocurre el ensamble y activación del complejo NADPH oxidasa (NOX2) con una subsecuente producción ROS. Este estudio también demostró que la inhibición de esta enzima utilizando difenileno yodonio (DPI) fue suficiente para detener la NETosis, por lo que se llegó a la conclusión de que la liberación de redes depende de la producción de ROS por NOX2. Estas observaciones se corroboraron utilizando neutrófilos provenientes de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (CGD) los cuales presentan una mutación en alguna de las subunidades que conforman a NOX2 (gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> o p47<sup>phox</sup>) interfiriendo con la producción de ROS. Los neutrófilos aislados a partir de estos pacientes fueron incapaces de formar NET al ser estimulados con *Aspergillus fumigatus* (Bianchi et al., 2009), mientras que los neutrófilos provenientes de pacientes sin esta alteración produjeron redes frente a este hongo.

La evidencia anterior se corroboró por distintos reportes que muestran la participación de las ROS provenientes de NOX2 en la producción de NET. Parker et al. (2012) observaron que los neutrófilos tratados con DPI fueron incapaces de producir NETs al ser estimulados con PMA, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. De igual forma, Kenny et al. (2017) realizaron una extensa caracterización de la NETosis inducida por diferentes estímulos encontrando que el pirocatecol (un pepenador de ROS) reduce la formación de NET cuando los neutrófilos son estimulados con PMA o con la levadura *C. albicans*.

El papel que desempeñan las ROS provenientes de NOX2 durante la producción de NET cada vez queda más claro y actualmente se entiende que participa en la descondensación de la cromatina, lo cual ocurre antes de la liberación del DNA al espacio extracelular. Las ROS generadas por NOX2 actúan sobre la NE, la cual forma parte de un complejo multienzimático localizado en la membrana de los gránulos azurófilos llamado azurosoma, el cual está formado también por

azurocidina (AZU), CG, MPO, lisozima, proteinasa 3 y lactotransferrina. La presencia de ROS causa la disociación de la NE, CG y AZU del complejo, las cuales llegan al citoplasma y en esta localización la NE degrada los filamentos de actina del citoesqueleto, arrojando al neutrófilo en este sitio. Posteriormente, se transloca hacia el núcleo (aproximadamente a los 60 min después del estímulo) en donde actúa sobre las histonas degradándolas con su actividad proteolítica generando de esta forma una relajación de la cromatina (Papayannopoulos et al., 2010; Metzler et al., 2014). La MPO se transloca posteriormente (2 h después de iniciado el proceso de NETosis) y favorece la descondensación de la cromatina en un mecanismo independiente de su actividad enzimática.

### **1.5.2.2 NETosis independiente de NOX2**

#### **1.5.2.2.1 Participación de PAD4**

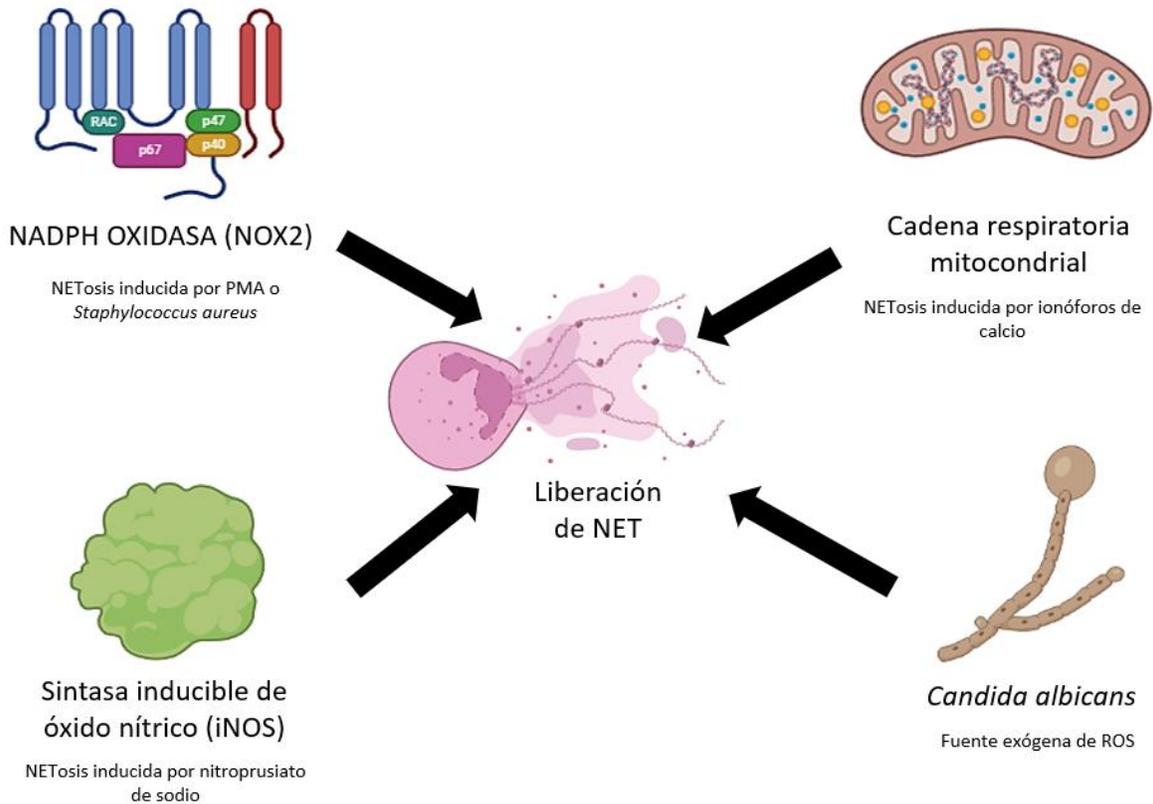
Otros mecanismos de NETosis han demostrado ser independientes de las ROS producidas por NOX2, en los que la descondensación de la cromatina ocurre por otros mecanismos. El modelo implica a la peptidilargininadesiminasa 4 (PAD4), una enzima presente en el núcleo de los granulocitos, la cual actúa sobre las histonas H2A, H3 y H4 presentes en el núcleo del nucleosoma y modifica sus colas transformando los residuos de arginina en citrulina (pasando de tener una carga positiva a tener una carga neutra) (Rohrbach et al., 2012). Su papel en la NETosis se describió por primera vez por Wang et al. (2009) demostrando que en células de la línea HL-60 (diferenciadas al linaje granulocítico) tratadas con ionóforos de calcio ocurre la citrulinación de histonas, descondensación de cromatina y formación de NET. Este hallazgo se corroboró posteriormente por Li et al. (2010) quienes observaron que los neutrófilos aislados de ratones con una mutación nula en el gen que codifica para la enzima PAD4 son incapaces de liberar NET al ser estimulados con LPS, PMA o peróxido de hidrógeno. Debido a que la actividad de esta enzima es dependiente de su unión a iones  $Ca^{2+}$ , se ha propuesto que el flujo descontrolado de  $Ca^{2+}$  al interior de la célula causado por ionóforos así como proteínas formadoras de poros (microbianas o inmunes),

provocan una hiperactividad de PAD4 desembocando en la liberación NET en un proceso denominado como hipercitrulinación leucotóxica (Konig y Andrade, 2016).

#### **1.5.2.2.2 Otros mecanismos independientes de las ROS de NOX2**

Otros trabajos han tratado de comprobar si las especies reactivas del nitrógeno (NRS) también son inductoras de NET. Los neutrófilos humanos expresan de forma constitutiva la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS) la cual genera óxido nítrico, que puede actuar como molécula señalizadora en diferentes procesos (Cedergren et al., 2003). Se ha demostrado que los neutrófilos tratados con donadores de óxido nítrico como el nitroprusiato de sodio o la S-nitroso-N-acetil-D,L-penicilamina (SNAP) liberan NET (Patel et al., 2010). Este hallazgo lo replicó Manda-Handzlik et al., (2019) quienes también demostraron que la estimulación con peroxinitrito es suficiente para llevar a los neutrófilos a NETosis, sin embargo, este mecanismo también depende de la generación de ROS por NOX2.

Finalmente, *C. albicans* es capaz de inducir NETosis en neutrófilos provenientes de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (CGD) los cuales carecen de NOX2 funcional, esto debido a que este microorganismo produce ROS durante el dimorfismo de la levadura en micelio. Estas ROS pueden permear en el neutrófilo y activar la señalización necesaria para liberar NET (Kenny et al., 2017). Esto se corrobora con otros estudios que muestran que la mera adición de ácido hipocloroso o hipoclorito de sodio es suficiente para inducir NETosis (Palmer et al., 2012; Akong-Moore et al., 2012).



**Figura 4. Fuentes de ROS involucradas en el proceso de NETosis.** Se han implicado diferentes fuentes de ROS que participan en el proceso de liberación de las NET. La primera fuente descrita fue el complejo NOX2 cuyo ensamble es inducido por patógenos como *Staphylococcus aureus* o moléculas sintéticas como el PMA. Los ionóforos de calcio como la ionomicina o el A23187 también inducen la generación de ROS desde la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. También se ha observado que los generadores de óxido nítrico como el nitroprusiato de sodio o la S-nitroso-Nacetil penicilamida inducen la liberación de NET. Finalmente, la fuente de ROS también puede ser exógena, pues el peróxido de hidrógeno adicionado de forma intencional o liberado por *Candida albicans* llevan a la liberación de NET.

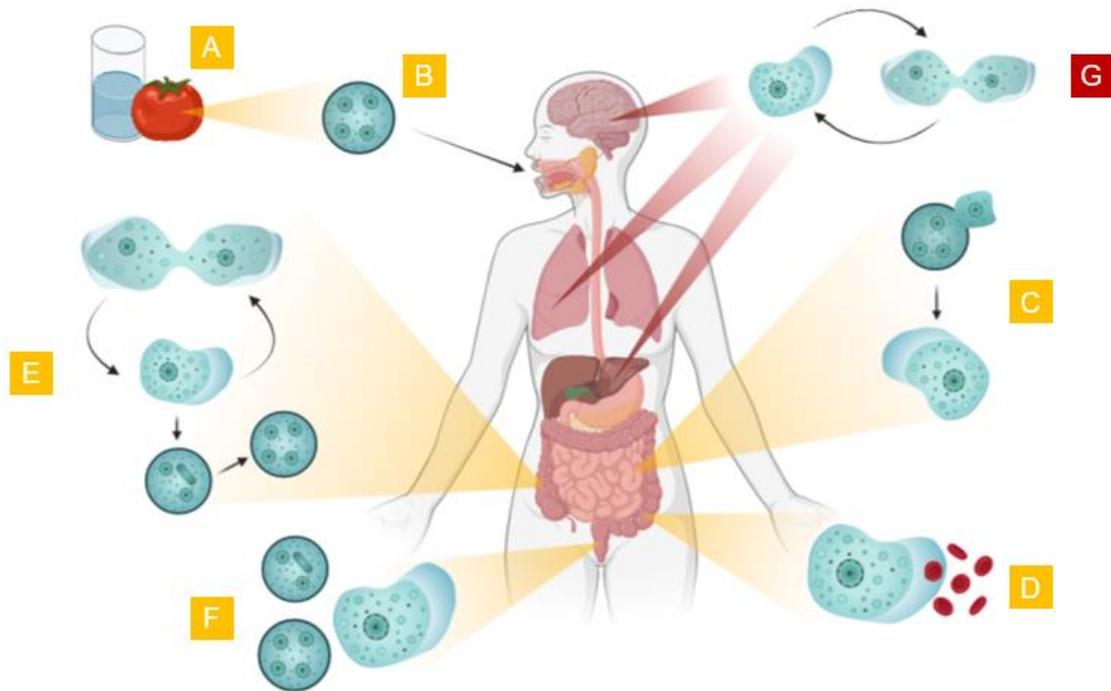
### 1.6 Generalidades de *Entamoeba histolytica*

*Entamoeba histolytica* es un protozoo parásito causante de la amibiasis, una enfermedad principalmente intestinal con alta prevalencia en países en vías de desarrollo (Shirley et al., 2018). Presenta dos estadios dentro de su ciclo de vida: el trofozoíto y el quiste. El trofozoíto es la forma metabólicamente activa y móvil, presentan un tamaño de 10-60  $\mu\text{m}$  de diámetro y se desplaza unidireccionalmente mediante la emisión de pseudópodos. Tiene un núcleo circular con un cariosoma central y la cromatina se distribuye de forma homogénea en la periferia; el endoplasma presenta numerosas vacuolas alimenticias las cuales pueden

contener bacterias o eritrocitos (Tanyuksel y Petri, 2003). Este se encuentra rodeado por el ectoplasma hialino, el cual no presenta vacuolas y a partir de él se emite el pseudópodo. En el extremo posterior del organismo se encuentra el uroide, que contiene el motor de actina/miosina, el cual impulsa al trofozoíto hacia adelante. Los quistes son la forma infectante, tienen forma esférica y miden de 10-15  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los quistes maduros tienen 4 núcleos con las mismas características que los presentes en los trofozoítos. Pueden presentar estructuras en forma de bastón con extremos romos llamadas cuerpos cromatoides, además, pueden presentar inclusiones de glucógeno los cuales son más comunes en quistes inmaduros binucleados. Este parásito carece de mitocondrias, pero en cambio, posee mitosomas que no realizan la respiración celular (Santos y Nozaki, 2022).

### **1.6.1 Ciclo de vida**

La infección por *E. histolytica* ocurre por la ingestión de quistes maduros tetranucleados, presentes en alimentos o agua contaminada con materia fecal de una persona infectada. El desenquistamiento ocurre en el intestino delgado en donde cada núcleo se divide por fisión binaria y se liberan 8 trofozoítos de pequeño tamaño (amébulas) las cuales comienzan a migrar hacia el intestino grueso y se reproducirán mediante fisión binaria. El enquistamiento se produce aparentemente por la desecación del parásito durante su trayecto en el intestino (Carrero et al., 2020). Tanto el trofozoíto como el quiste son eliminados en las heces, pero el quiste se protege con una pared de quitina que lo recubre y puede sobrevivir en el medio ambiente por días o semanas, mientras que los trofozoítos mueren rápidamente fuera del cuerpo y su ingestión no produce la enfermedad ya que no sobreviven a la acción de los jugos gástricos. En algunos pacientes los trofozoítos invaden la mucosa intestinal, alcanzan el torrente sanguíneo y de allí llegan a localizaciones extraintestinales como hígado, pulmones y cerebro. La transmisión también puede ocurrir a través de la exposición con materia fecal durante el contacto sexual (oroanal o anogenital).



**Figura 5. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*.** A) La infección se adquiere por vía oral B) en donde se encuentra el quiste maduro tetranucleado (forma infectante). C) El quiste libera a los trofozoítos (fase vegetativa) los cuales se desplazan hasta el intestino grueso. D) Los trofozoítos se alimentan de las bacterias intestinales y si perforan la mucosa intestinal se alimentan de glóbulos rojos. E) Los trofozoítos se dividen por fisión binaria y algunos se transforman en quistes. F) Durante los episodios de diarrea los trofozoítos y quistes se expulsan en las heces, pero solo los quistes pueden infectar a otros individuos. G) En algunos casos la infección es extraintestinal por diseminación hemática hacia hígado, pulmones o cerebro. Imagen elaborada en BioRender.com.

### 1.6.2 Patogenia

La lesión inicial ocurre en el colon, principalmente en el colon sigmoideo o en el ciego. El tránsito intestinal lento en estas localizaciones parece ser un factor importante en la invasión de la mucosa debido a que el trofozoíto tiene un lapso mayor para establecer contacto con la mucosa y por permitir cambios en la luz del intestino que permiten la invasión al tejido (Baxt y Singh, 2008). Los trofozoítos se adhieren a la capa de moco del intestino gracias a la presencia de la lectina de unión a Gal/GalNac que tiene como blancos los residuos de N-acetil-D-galactosamina. Una vez adheridos, los trofozoítos pueden lisar a las células epiteliales de la mucosa intestinal, lo cual se ha relacionado con la presencia de diferentes enzimas como la sialidasa, N-acetilgalactosamidasa y la N-

acetilglucosaminidasa, las cuales les permiten a los trofozoítos romper la capa de moco y llegar al epitelio (Cornick y Chadee, 2017). La muerte por contacto desencadenada por el trofozoíto se ha relacionado con otros factores de virulencia como la proteasa de cisteína y al ameboporo (un péptido formador de poros en la célula blanco). La úlcera inicial es superficial y puede desencadenar una invasión a la capa submucosa y muscularis hasta desarrollarse la lesión crónica en forma de cuello de botella (Thibeaux et al., 2013). Si los trofozoítos logran el acceso a los vasos sanguíneos o linfáticos puede ocurrir su diseminación a otras localizaciones, principalmente hígado en donde se desarrolla el absceso amebiano.

### **1.6.3 Manifestaciones clínicas**

Cerca del 90% de las infecciones por este parásito se cursan de forma asintomática y la aparición de síntomas está ligada a factores como la edad, malnutrición, alcoholismo, embarazo o el uso de corticoesteroides (Baxt y Singh, 2008).

La amibiasis intestinal cursa con una variedad de síntomas que van desde una diarrea leve hasta disentería severa acompañada de dolor abdominal. La presencia de fiebre es poco frecuente y la mayoría de los síntomas son inespecíficos, por lo que debe de hacerse el diagnóstico diferencial contemplando otras enfermedades infecciosas intestinales como salmonelosis, infección por *Campylobacter* sp. o las variantes enterohemorrágicas de *Escherichia coli*. Las complicaciones son poco frecuentes, pero pueden incluir megacolon tóxico, colitis necrotizante y ulceración perianal fistulizada (Ortiz-Castillo et al., 2012). El absceso hepático amebiano es la forma más común de amebiasis extraintestinal y se caracteriza por fiebre constante y dolor en el cuadrante superior derecho del abdomen. Esta entidad clínica se ha asociado con un 89% de mortalidad (Torre y Kershenobich, 2002).

## **1.6.4 Respuesta inmune en la amibiasis**

### **1.6.4.1 Inmunidad innata**

El ácido estomacal es la primera barrera a la que se enfrenta *E. histolytica* una vez que ha ingresado en el ser humano. Si bien los trofozoítos son destruidos en el estómago por acción del ácido gástrico, los quistes son resistentes a él y pueden continuar su trayecto (Nakada-Tsukui y Nozaki, 2016). La capa de moco del intestino es otra barrera que puede evitar la colonización por parte del parásito debido a que esta tiene como principal constituyente a la mucina, una glicoproteína que se une e inhibe a la lectina de Gal/GalNac; sin embargo, los trofozoítos poseen proteasas y glicosidasas que les permiten penetrar esta capa y colonizar la mucosa intestinal. Las células del epitelio intestinal una vez que entran en contacto con *E. histolytica* secretan IL-8, la cual recluta a células del sistema inmune. Los primeros en acudir son los neutrófilos los cuales han demostrado tener actividad amebicida al ser estimulados con INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  o LPS. La principal actividad amebicida atribuible al neutrófilo es la producción de ROS y su desgranulación.

Los macrófagos también juegan un papel importante en la defensa contra este parásito ya que se activan por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, especialmente el lipopeptidofosfoglicano (LPPG) vía TLR2 y TLR4 produciendo citocinas proinflamatorias, además, producen óxido nítrico, del cual se ha comprobado su actividad amebicida (Maldonado-Bernal et al., 2005).

#### **1.6.4.1.1 Papel del neutrófilo en la amibiasis**

En modelos animales de absceso hepático amibiano se han encontrado neutrófilos en el hígado tan solo 30 min después de haberse administrado los trofozoítos vía intraportal (Campos-Rodríguez et al., 2016). La abundancia relativa de estas células durante el proceso inflamatorio en la formación del absceso hepático amibiano (AHA) ha sido estimada en un 78% a las 3 horas después de la inducción (Shibayama et al., 1998). De acuerdo con este estudio, en este periodo

los neutrófilos rodean a los trofozoítos manteniendo un estrecho contacto; los trofozoítos no muestran aparentes señales de daño e incluso se observan neutrófilos dentro de vacuolas fagocíticas en el citoplasma de los trofozoítos. Después de 6 h se observa que los neutrófilos carecen de gránulos en su citoplasma y contienen vacuolas que contienen restos de membrana y detritus.

Algunas evidencias apuntan a que los neutrófilos tienen un papel protector durante las amibiasis. Los neutrófilos activados con INF- $\gamma$  han demostrado tener actividad amebicida *in vitro* y este efecto se ve potenciado cuando se pretratan con INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en conjunto (Denis y Chadee, 1989). En un modelo murino, a los animales se les redujeron los neutrófilos con un anticuerpo monoclonal contra RB68C5, después de la inducción del AHA (inyectando trofozoítos directamente en la vena porta), los ratones con neutrófilos reducidos mostraron abscesos de mayor tamaño comparado con el grupo control (Seydely Stanley, 1997). Sin embargo, también existe evidencia que apunta a que los neutrófilos podrían estar jugando un papel importante en el daño durante la amibiasis, Tsutsumi et al. (1984) observaron que durante la formación del AHA en hámster, los trofozoítos no establecían interacciones frecuentes con los hepatocitos, por lo que atribuyeron a que el daño causado por el trofozoíto no era por un mecanismo lítico directo, y en su lugar, este era causado por la acumulación y posterior lisis de leucocitos (incluyendo neutrófilos).

#### **1.6.4.2 Inmunidad adaptativa**

En el suero de personas que padecen amibiasis se detectó la presencia de anticuerpos de la clase IgG dirigidos contra la Gal/GalNac lectina de este parásito. Aún más importante, se ha demostrado la presencia de anticuerpos de la clase IgA en la saliva y las heces de algunas de ellas comprobándose un efecto protector debido a la menor incidencia que tiende a presentar reinfecciones con respecto a pacientes que carecen de estos anticuerpos (Carrero et al, 1994; Haque et al., 2001). La inmunidad celular también es un factor determinante en la resolución de la infección pues la aparición de un perfil Th2 está asociado al mantenimiento de la infección, mientras que un perfil Th1 se asocia con la

resolución de la enfermedad en modelos experimentales al potenciar la actividad antimicrobiana de macrófagos (Guo et al., 2008). La participación del perfil Th17 es indeterminado debido a que existe evidencia de que la producción de IL-17 ayuda a la resolución de la infección, lo cual se contrapone con otro reporte que sugiere que la presencia de IL-17A contribuye a la persistencia de los trofozoítos (Guo et al., 2011; Deloer et al., 2017).

## **2. ANTECEDENTES**

El papel del neutrófilo durante la infección por *E. histolytica* aún no está completamente definido. Este leucocito, es el primero en aparecer en los infiltrados inflamatorios amibianos y parece coadyuvar a la protección en modelos neutropénicos (Asgharpour et al., 2005), pero también parece ser responsable de la patología en modelos inmunosuprimidos según nuestras observaciones (Olivos-García et al., 2007).

Nuestro grupo de trabajo realizó la primera descripción de la NETosis inducida por los trofozoítos de *E. histolytica* encontrándose que estas redes se liberan tan solo 5 min después de la interacción neutrófilo-trofozoíto, siempre y cuando el parásito se encuentre viable, ya que los trofozoítos fijados con formaldehído no indujeron NET, mientras que el extracto total de los trofozoítos solo indujo escasamente su formación (Ávila et al., 2016). En estas redes se evidenció la presencia de catelicidina y se determinó que los trofozoítos tratados con NET inducidas por PMA no disminuyeron su viabilidad ni perdieron su capacidad para inducir abscesos hepáticos en un modelo de hámster dorado.

Como continuación de este trabajo, se determinó que el proceso de NETosis inducido por los trofozoítos de *E. histolytica* depende de la actividad de proteasas de serina y se asoció con la migración de la NE al núcleo (Díaz-Godínez et al., 2018). Sin embargo, la formación de NET fue independiente de la generación de ROS derivadas de NOX2 debido a que la inhibición de este complejo con apocinina no afectó la liberación de NET; es más, no se detectó aumento en la

generación de ROS por parte de los neutrófilos después de interactuar con los trofozoítos. La inhibición de la enzima PAD4 con GSK484 tampoco afectó la NETosis inducida por los trofozoítos sugiriendo que no participa en este mecanismo, sin embargo, la quelación del calcio extracelular redujo significativamente la cantidad de DNA liberado y se detectó la presencia de proteínas citrulinadas en las NET. Bajo esta línea, demostramos que las amibas promueven la internalización de calcio en los neutrófilos durante su interacción y que el proceso de NETosis inducido por los trofozoítos requiere la activación de la vía Raf/MEK/ERK (Fonseca et al, 2018).

Recientemente, describimos que *Entamoeba dispar*, una amiba no patógena emparentada con *E. histolytica*, no induce la liberación de NET en neutrófilos humanos (Fonseca et al., 2019; Díaz-Godínez et al., 2020). En este trabajo también se observó que la liberación temprana de DNA únicamente ocurre en los neutrófilos que están en contacto directo con los trofozoítos de *E. histolytica* y que el tratamiento de estos leucocitos con carbohidratos que poseen un hidroxilo axial en la posición 4 son eficientes para reducir o inhibir la NETosis, sugiriendo que una molécula tipo lectina puede estar mediando el fenómeno.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los diversos trabajos realizados para comprender la NETosis indican que existen múltiples mecanismos para llevar a cabo la liberación de las NET dependiente del estímulo empleado, pero todos ellos parecen depender de la generación de ROS. Los mecanismos de NETosis bien caracterizados son pocos y los estudios se han centrado en analizar este fenómeno inducido por agentes simples como el PMA o los ionóforos de calcio y no por patógenos completos. Los trofozoítos de *E. histolytica* parecen inducir NETosis por una vía no convencional, ya que todos nuestros estudios sugieren que es independiente de las ROS provenientes de NOX2 del neutrófilo; sin embargo, se requieren más estudios para poder garantizar que este mecanismo ocurre con o sin la presencia de ROS, o quizá de alguna otra fuente, interna como la mitocondria de los neutrófilos, o externa al

neutrófilo, como el propio trofozoíto. Por otra parte, aún no existe evidencia de la formación de NET por el trofozoíto *in vivo*, y por ende su papel en protección o patología durante la amibiasis se desconoce.

La importancia de identificar los mecanismos moleculares asociados a la formación de NET por los trofozoítos estriba en el hecho de que podríamos identificar blancos a través de los cuales esta NETosis puede inhibirse, y, por ende, podríamos evaluar la participación de este mecanismo de la inmunidad innata durante el desarrollo de la amibiasis, tanto intestinal como extraintestinal, en modelos animales de infección. Esto es sumamente importante en el campo de la amibiasis, ya que podría contribuir a dilucidar el verdadero papel del neutrófilo durante la enfermedad, lo que, a su vez, podría tener impacto en el control de ésta.

#### **4. HIPÓTESIS**

Las ROS generadas por los trofozoítos de *E. histolytica* participan en la NETosis inducida por los trofozoítos.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo general**

Determinar si la formación de NET en respuesta a trofozoítos de *Entamoeba histolytica* requiere la presencia de ROS de origen diferente a NOX2 o si es independiente de ROS.

##### **5.2 Objetivos particulares**

- 1) Verificar que la NETosis inducida por *E. histolytica* es independiente de las ROS derivadas de NOX2.
- 2) Determinar si la NETosis inducida por los trofozoítos depende de su viabilidad.

- 3) Determinar la participación de las ROS mitocondriales en la NETosis inducida por los trofozoítos.
- 4) Determinar si hay producción de ROS por los trofozoítos de *E. histolytica* en cultivo.
- 5) En caso de que los trofozoítos produzcan ROS, estudiar la transferencia de ROS hacia los neutrófilos.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Diagrama general de trabajo

El trabajo experimental se desarrolló de acuerdo con el esquema mostrado en la Figura 6.

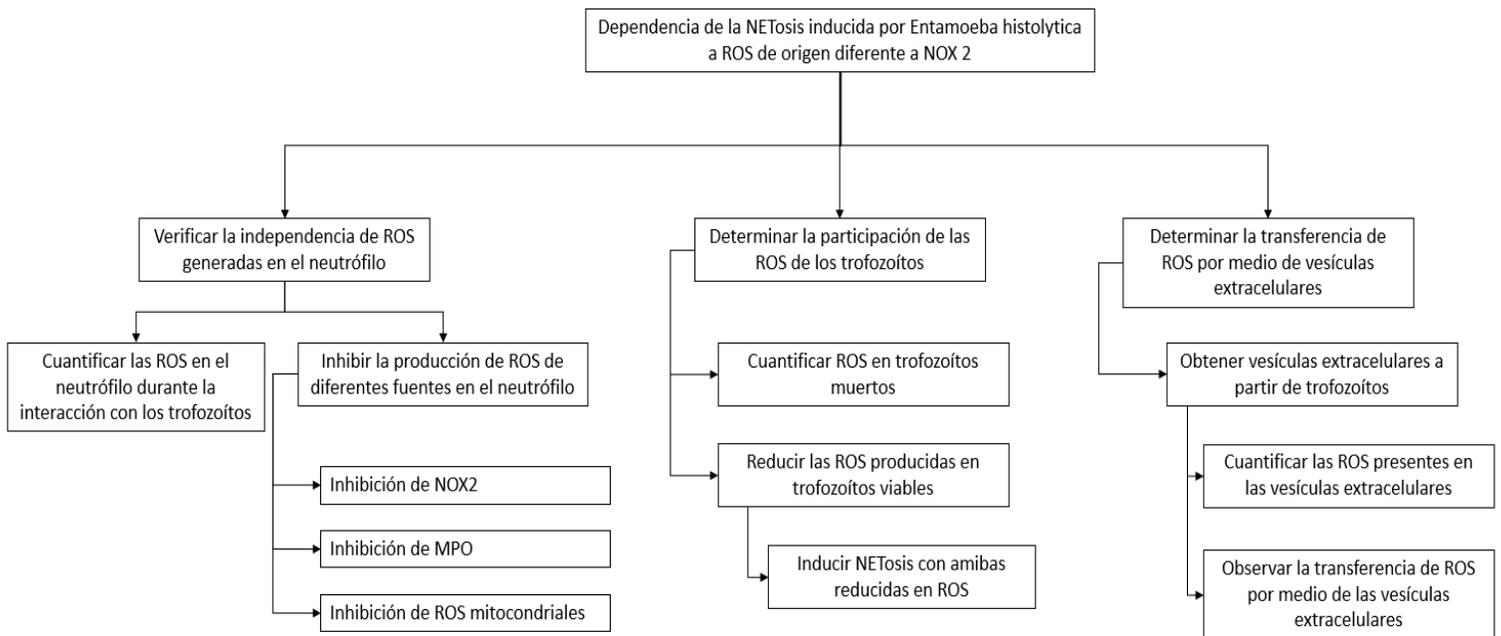


Figura 6. Diagrama general de trabajo.

### 6.2 Trofozoítos de *Entamoeba histolytica*

Se utilizó la cepa de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS. Los trofozoítos se cultivaron axénicamente en medio TYI-S-33 suplementado con vitaminas Diamond

en solución de Tween (Merck) y 15% de suero bovino de adulto (Microlab). Los trofozoítos se incubaron durante 72 h a 37°C hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento. El cultivo se colocó en hielo durante 10 min, el contenido se repartió en tubos Falcon de 15 ml y se centrifugaron a 1,400 rpm durante 5 min. El medio se decantó, se hicieron lavados adicionando 5 mL de PBS pH 7.4 (PBS) al tubo, el botón se resuspendió y se centrifugó a 1,400 rpm durante 5 min (3 lavados totales). Cada botón se resuspendió en PBS para realizar la cuenta de los trofozoítos en cámara de Neubauer. Para algunos experimentos los trofozoítos se fijaron con formaldehído (Merck) al 3.5% en PBS durante 20 min o se inactivaron por calor incubándolas a 56°C durante 30 min. En ambos casos, los trofozoítos se lavaron con PBS tres veces antes de su uso.

### **6.3 Purificación de los neutrófilos**

Este trabajo se realizó de acuerdo con la aprobación y recomendaciones del comité de ética para estudios en humanos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM (FMED/CI/RGG/013/01/2008). Se obtuvo sangre total a partir de donadores considerados sanos, mayores de edad, con previo consentimiento informado firmado por escrito y los neutrófilos se aislaron de acuerdo con García-García et al. (2013). Para ello, se colocaron 10 ml de sangre en un tubo conteniendo 0.25 mL de heparina (1,000 U/mL; Inepar) y 2 ml de Dextrán (Merck) al 6% en PBS. El tubo se mezcló por inversión y se dejó sedimentar durante 40 min a temperatura ambiente. El plasma rico en leucocitos se estratificó en un tubo conteniendo 5 ml de Ficoll-Paque® (General-Electric) y se centrifugó a 1,400 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se eliminó y los glóbulos rojos se lisaron adicionando 10 ml de solución hipotónica fría (NaCl 30 mM, HEPES 20 mM, BSA 1%), se agitó por 1 min, posteriormente se adicionaron 10 ml de solución hipertónica fría (NaCl 270 mM, HEPES 20 mM, BSA 1%) y se centrifugó a 1,400 rpm durante 5 min. El sobrenadante se eliminó, la pastilla se resuspendió en 15 ml de PBS (se tomó una alícuota para hacer el conteo de células en cámara de Neubauer) y la suspensión de neutrófilos se colocó en baño de hielo hasta su uso.

#### **6.4 Cuantificación de las NET inducidas con trofozoítos de *E. histolytica***

Para la cuantificación de NET se tomaron  $5 \times 10^5$  neutrófilos y se centrifugaron a 4,000 rpm durante 2 min y se resuspendieron en 500  $\mu$ l de medio RPMI-1640 (Biological Industries) suplementado con 5% de suero bovino fetal (FBS; Gibco) y adicionado con SYTOX® Green (500 nM; Invitrogen) el cual es un colorante que se une al DNA emitiendo fluorescencia verde cuya intensidad depende de la concentración de DNA, además, es incapaz de penetrar en células viables, por lo que únicamente se une al DNA extracelular o al DNA de células que tienen dañada su membrana citoplasmática. Se tomó una alícuota de 100  $\mu$ l a partir de la suspensión celular ( $1 \times 10^5$  neutrófilos) y se colocó en una placa de 96 pozos (Corning). La placa se dejó sedimentar durante 20 min a 37°C y los neutrófilos se estimularon con  $1 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$  o  $1 \times 10^4$  trofozoítos de *E. histolytica* (proporciones de trofozoíto:neutrófilo de 1:100, 1:50, 1:20 y 1:10, respectivamente). En otros experimentos los neutrófilos se estimularon con  $5 \times 10^3$  trofozoítos fijados con formaldehído o inactivados por calor. Los cocultivos se incubaron a 37°C y la fluorescencia se midió durante 4 h desde el fondo de los pozos usando un espectrofluorómetro Synergy HTX (BioTek) con un filtro de excitación de 485 nm y uno de emisión de 528 nm. Como controles positivos de NETosis se utilizó acetato miristato de forbol a 50 nM (PMA; Merck) y el ionóforo de calcio A23187 a 10  $\mu$ M (Merck). Los experimentos se realizaron 3 veces por triplicado.

#### **6.5 Tratamiento de los neutrófilos con los inhibidores**

Para determinar el papel que tiene NOX2 en la NETosis inducida por los trofozoítos, los neutrófilos ( $5 \times 10^5$ ) se resuspendieron en 500  $\mu$ l de PBS adicionado con el inhibidor apocinina (400  $\mu$ M; Merck) o con el vehículo DMSO (0.1%) y se pretrataron durante 30 min a 4°C. Las células se centrifugaron a 4,000 rpm durante 2 min, se resuspendieron en 500  $\mu$ l de medio RPMI 1640 adicionado con apocinina o el vehículo a las mismas concentraciones y la cuantificación de la NETosis se realizó como se indicó en el apartado 6.4.

La participación de otras fuentes de ROS provenientes del neutrófilo se determinó de la siguiente manera. Los neutrófilos ( $5 \times 10^5$ ) se resuspendieron en 500  $\mu$ l de PBS adicionado de los siguientes inhibidores o pepenadores por separado: pirocatecol (200  $\mu$ M), catalasa (200 UI/ml), luminol (50, 100 y 200  $\mu$ M), isoluminol (50, 100 y 200  $\mu$ M), mitoTEMPO (400  $\mu$ M) o dinitrofenol (DNP, 200  $\mu$ M). Como control negativo se utilizaron los respectivos vehículos: DMSO (0.1%) para el pirocatecol, luminol, isoluminol, mitoTEMPO y DNP; así como agua para la catalasa (todos los reactivos fueron suministrados por Merck). Los neutrófilos se pretrataron durante 30 min a 4°C. Las células se centrifugaron a 4,00 rpm durante 2 min, se resuspendieron en 500  $\mu$ l de medio RPMI 1640 adicionado con el respectivo inhibidor o el vehículo a las mismas concentraciones y la cuantificación de la NETosis se realizó como se indicó en el apartado 6.4.

## **6.6 Inmunofluorescencia de las NET**

Para visualizar las NET, se colocaron  $2 \times 10^5$  neutrófilos resuspendidos en 100  $\mu$ L de medio RPMI-FBS 5% sobre cubreobjetos circulares pretratados con una solución de poli-L-lisina (Merck), se dejaron sedimentar por 20 min a temperatura ambiente y se estimularon con  $1 \times 10^4$  trofozoítos (viables, fijados o inactivados) o con los controles positivos PMA (20 nM) y A23187 (10  $\mu$ M). Los cultivos se incubaron durante 4 h a 37°C y se fijaron con formaldehído (concentración final 3.7%) por 20 min. El fijador se lavó con PBS (3 lavados de 5 min) y a cada pozo se le adicionaron 100  $\mu$ l de Tritón X-100 (BioRad) al 0.1% en PBS durante 10 min. El detergente se lavó con PBS y se adicionaron 100  $\mu$ l de solución de bloqueo (BSA 1%-Glicina 22.52mg/mL-Tween 20 0.1% en PBS) por 30 min a temperatura ambiente. Se retiró la solución de bloqueo y se adicionaron 100  $\mu$ l de los anticuerpos primarios contra los constituyentes de las NET: anti-NE (Santa Cruz Biotechnology), anti-MPO (Abcam) o anti-histona acetilada H4 (abcam) diluidos 1:100 en PBS-Tween 0.1%-BSA 1% y se dejaron incubar por 1 h a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se eliminó el anticuerpo primario correspondiente y los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS frío por 5 min, posteriormente, se adicionaron 100  $\mu$ L del anticuerpo secundario chivo anti-ratón

acoplado a FITC (Sigma-Aldrich; para la detección de NE y MPO) o del anticuerpo chivo anti-conejo acoplado a TRITC (ZyMax; para la detección de la histona acetilada H4) diluidos 1:50 en PBS-Tween 0.1%-BSA 1%. La incubación se realizó por 1 h a temperatura ambiente, los cubreobjetos se lavaron con PBS y se les adicionaron 100  $\mu$ l de DAPI 5  $\mu$ g/mL en PBS el cual se dejó incubar por 15 min. Los pozos se lavaron una vez más y la preparación se montó con FluoroShield. Las muestras se observaron con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51) y las imágenes se procesaron utilizando el software ImageJ.

### **6.7 Cuantificación de ROS intracelulares en los neutrófilos**

La generación de ROS se determinó usando el indicador 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA). Para ello,  $5 \times 10^5$  neutrófilos se resuspendieron en 500  $\mu$ l de PBS adicionado con H<sub>2</sub>DCFDA (10  $\mu$ M) (Merck) y se incubaron por 30 min a 37°C en oscuridad. Una vez finalizada la incubación, las células se centrifugaron a 4,000 rpm durante 2 min y se resuspendieron en 500  $\mu$ l de medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 5%. Posteriormente, 100  $\mu$ l de la suspensión ( $1 \times 10^5$  neutrófilos) se transfirieron a una placa de 96 pozos y después de una sedimentación de 20 min a 37°C, las células se estimularon con  $1 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^3$  o  $5 \times 10^3$  trofozoítos viables de *E. histolytica* (proporciones trofozoíto:neutrófilo 1:100, 1:50 y 1:20, respectivamente). La intensidad de la fluorescencia después de una incubación de 1 h a 37°C desde el fondo del pozo utilizando un espectrofluorómetro Synergy HTX con un filtro de excitación de 485 nm y uno de emisión de 528 nm. Como controles positivos de la producción de ROS se utilizó PMA (50 nM) y A23187 (10  $\mu$ M). Los experimentos se realizaron 3 veces por triplicado.

### **6.8 Cuantificación de ROS mitocondriales en los neutrófilos**

Los neutrófilos ( $5 \times 10^5$ ) se resuspendieron en 500  $\mu$ l de PBS adicionado con MitoSOX™ Red (10  $\mu$ M) y se incubaron durante 30 min a 4°C. Después de este tiempo las células se centrifugaron a 4,000 rpm durante 2 min, se resuspendieron en 500  $\mu$ l de medio RPMI-1640 suplementado con 5% de FBS y 100  $\mu$ l de la suspensión se transfirieron a una placa de 96 pozos. Las células se estimularon

con  $1 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$  o  $1 \times 10^4$  trofozoítos de *E. histolytica* (proporciones de trofozoíto:neutrófilo de 1:100, 1:50, 1:20 y 1:10, respectivamente) y la fluorescencia se leyó desde el fondo del pozo utilizando un espectrofluorómetro Synergy HTX con un filtro de excitación de 485 nm y uno de emisión de 580 nm. Como controles positivos de la producción de ROS mitocondriales se utilizó PMA (50 nM) y A23187 (10  $\mu$ M). Los experimentos se realizaron 3 veces por triplicado.

### **6.9 Cuantificación de ROS en los trofozoítos de *E. histolytica***

Se determinó la producción de ROS en trofozoítos de *E. histolytica* viables, fijados con formaldehído o inactivados con calor. Para ello se tomaron  $5 \times 10^5$  trofozoítos y se resuspendieron en 500  $\mu$ l de PBS adicionado con H<sub>2</sub>DCFDA (100  $\mu$ M). Los trofozoítos se incubaron por 1 h a 37°C y posteriormente se centrifugaron a 4,000 rpm durante 2 min. Después de desechar el sobrenadante, los trofozoítos se resuspendieron en 500  $\mu$ l de medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 5% y 100  $\mu$ l de la suspensión se transfirieron a una placa de 96 pozos. Las células se sedimentaron durante 10 min a 37°C y la fluorescencia se leyó desde el fondo del pozo utilizando un espectrofluorómetro Synergy HTX con un filtro de excitación de 485 nm y uno de emisión de 528 nm.

### **6.10 Reducción de las ROS en los trofozoítos de *E. histolytica* y su efecto en la NETosis**

Los trofozoítos ( $5 \times 10^5$ ) se resuspendieron en 500  $\mu$ l de PBS adicionado con los siguientes pepenadores de ROS: pirocatecol (50, 100 y 200  $\mu$ M), luminol (50, 100 y 200  $\mu$ M) o el vehículo DMSO (0.1%). Los trofozoítos se incubaron durante 30 min a 37°C, se adicionó H<sub>2</sub>DCFDA (100  $\mu$ M) y las células se incubaron por 30 min más. Posteriormente, la fluorescencia se determinó como está indicado en el punto 6.9. En algunos experimentos seleccionados estos trofozoítos tratados para la disminución de ROS utilizando pirocatecol se fijaron con formaldehído (3.5%) y se contratiñeron utilizando DAPI (5  $\mu$ g/ml). Las células se lavaron 3 veces utilizando PBS, después del último lavado se resuspendieron en 50  $\mu$ l de FluoroShield® y una alícuota de 20  $\mu$ l se montó para ser observada con un

microscopio de fluorescencia (Olympus BX51). Las imágenes se procesaron utilizando el software ImageJ.

En otros experimentos, los trofozoítos ( $5 \times 10^5$ ) se resuspendieron en 500  $\mu$ l de PBS y se trataron con los pepenadores pirocatecol (50, 100 y 200  $\mu$ M), luminol (50, 100 y 200  $\mu$ M) o el vehículo DMSO (0.1%) y se incubaron durante 1 h a 37°C. Los tofozoítos se centrifugaron a 4,000 rpm durante 2 min, se resuspendieron en 500  $\mu$ l de PBS y se utilizaron como estímulo para cuantificar NET como se indicó en el punto 6.4.

### **6.11 Detección de la actividad de MPO**

Los neutrófilos ( $5 \times 10^5$ ) se centrifugaron a 4,000 rpm durante 2 min y se resuspendieron en 500  $\mu$ l de medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 5% y luminol (200  $\mu$ M) o isoluminol (200  $\mu$ M). Posteriormente, se tomaron 100  $\mu$ l de la suspensión ( $1 \times 10^5$ ) y se colocaron en una placa de 96 pozos. Los neutrófilos se sedimentaron por 20 min a 37°C y se estimularon con  $1 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$  o  $1 \times 10^4$  trofozoítos de *E. histolytica* (proporciones de trofozoíto:neutrófilo de 1:100, 1:50, 1:20 y 1:10, respectivamente). Los cocultivos se incubaron a 37°C durante 4 h y la emisión de luz se leyó cada 5 min desde el fondo del pozo usando un espectrofluorómetro Synergy HTX. El PMA (50 nM) y el A23187 (10  $\mu$ M) se utilizaron como controles positivos.

### **6.12 Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares de *E. histolytica***

Para realizar el aislamiento de las vesículas extracelulares (EV) se tomaron  $7.5 \times 10^5$  trofozoítos y se centrifugaron a 1,400 rpm durante 5 min. Posteriormente, el botón de células se lavó 3 veces con PBS pH 7.4 e inmediatamente se resuspendieron en 3 ml de medio RPMI-1640 libre de suero. La suspensión celular se colocó en una placa de 24 pozos y se incubó durante 1 h a 37°C. Después de la incubación se recolectó el sobrenadante y se colocó en un tubo cónico para centrifugarse a 1,400 rpm durante 5 min. Se tomaron 2.5 ml del sobrenadante libre de células y se filtró a través de una membrana con diámetro de poro de 0.22  $\mu$ m

(Corning). Las EV se purificaron usando el reactivo *Total Exosome Isolation (from cell culture media*; Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las EV obtenidas se resuspendieron en PBS pH 7.4 filtrado y se determinó la concentración de proteína usando el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Fisher). El tamaño de las EV se determinó en el equipo Nanosight NS3000 (Malvern Panalytical) por triplicado.

### **6.13 Microscopía electrónica de transmisión de las EV**

Las EV obtenidas se procesaron para microscopía electrónica de transmisión como se reportó anteriormente (Ramírez-Ricardo et al, 2021). Se suspendieron las EV (~ 10 mg) en 100 ml de PBS estéril, de los cuales se adsorbieron 30 ml durante 5 minutos en rejillas de cobre recubiertas de carbón con malla formvar (0.3%) a temperatura ambiente. Las rejillas se tiñeron con solución de acetato de uranilo (2%) durante 30 segundos y se eliminó el exceso de líquido. Las rejillas se secaron al aire y se analizaron a 80 kV utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEM 1400 (JEOL) equipado con una cámara digital Veleta (Olympus SIS).

### **6.14 Tinción de lípidos de las EV y su interacción con los neutrófilos**

Para la tinción de lípidos de las EV se mezcló un volumen de 10 µl de suspensión de EV provenientes de los trofozoítos con 3 µl de colorante fluorescente DiO (Thermo Fisher) (dilución 1:10 en PBS pH 7.4) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se colocaron 1.5 µl de las EV teñidas en una cama de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% (BioRad; 3 mm de espesor) y se cubrieron con un cubreobjetos. En otros experimentos diseñados para evaluar la interacción entre las EV de los trofozoítos y los neutrófilos humanos, se tomaron 10 µg de EV teñidas con Dil (Thermo Fisher) y se agregaron a 100 µl de medio RPMI-1640 que contenía  $2 \times 10^5$  neutrófilos humanos. Las células se incubaron durante 10 min y luego se fijaron con formaldehído (3.5%) durante 20 min. Después de la fijación, las células se lavaron 3 veces con PBS, se tiñeron con DAPI (5 µg/ml) y se resuspendieron en 50 µl de Fluoroshield™ (Merck). Las EV se visualizaron utilizando un microscopio confocal Nikon A1R+ para fotografías y

vídeos. Las imágenes se amplificaron utilizando el software de visualización de elementos NIS (Nikon).

### **6.15 Transferencia de ROS mediada por EV**

Para determinar la transferencia de ROS mediada por las EV, se tomó un volumen de EV equivalente a 10 µg de proteína y se le adicionó H<sub>2</sub>DCFDA 10 µM. La suspensión se incubó a 37°C durante 30 min en la oscuridad. Las EV marcadas se adicionaron a un cultivo de 2 x 10<sup>5</sup> neutrófilos en 100 µl de medio RPMI-1614 libre de suero y se incubaron durante 30 min a 37°C en oscuridad. El cultivo se fijó con formaldehído 3.5% durante 20 min y posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS. Se realizó una contratinción con Hoechst (5 µg/ml) y las células se resuspendieron en 50 µl de Fluoroshield<sup>TM</sup> (Merk). Las muestras se montaron para su observación en un microscopio confocal Nikon A1R+.

### **6.16 Análisis estadístico**

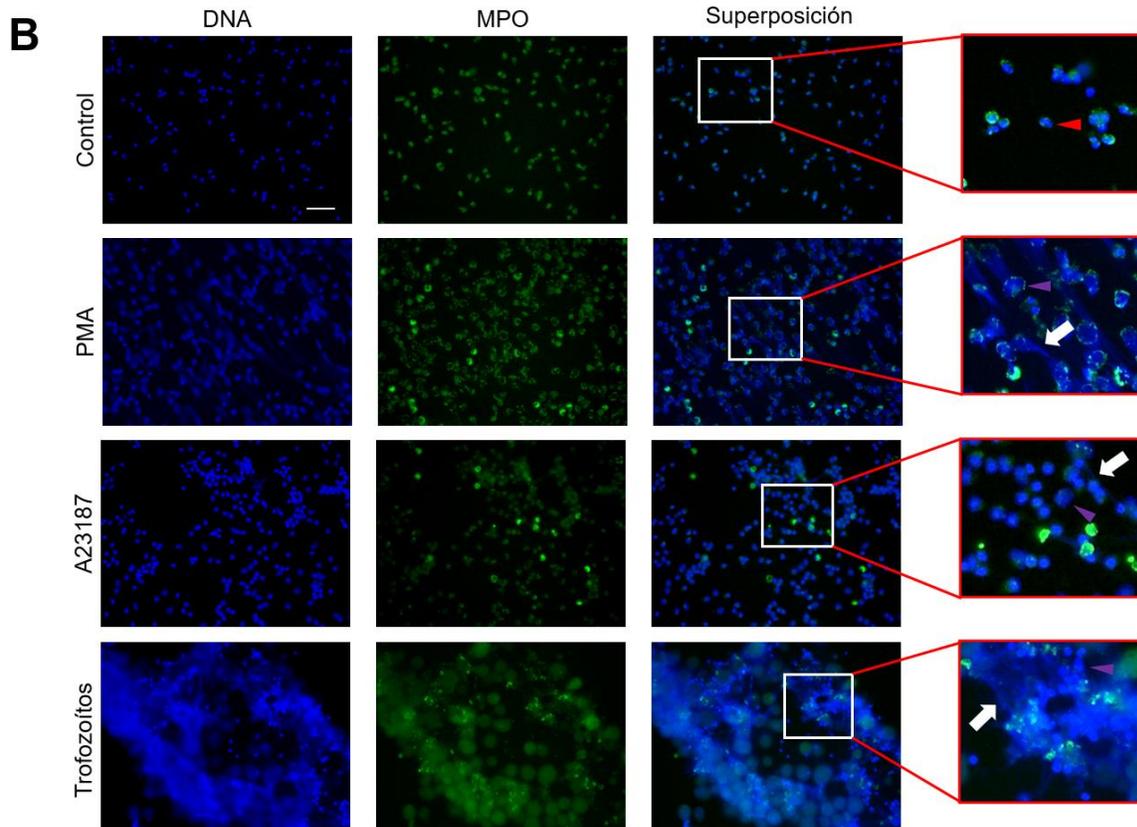
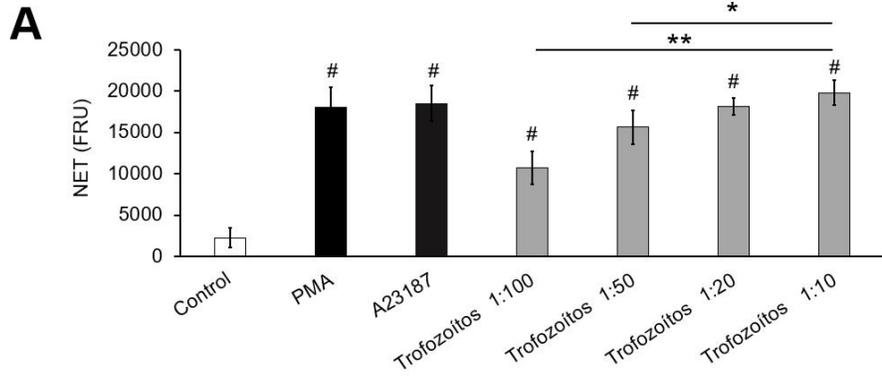
Los datos se muestran como la media ± la desviación estándar, la existencia de significancia estadística se determinó con las pruebas *t* de Student, U de Mann-Whitney o ANOVA de una vía con una prueba de Tukey *post hoc*. Un valor de *p* < 0.05 fue considerado como estadísticamente significativo.

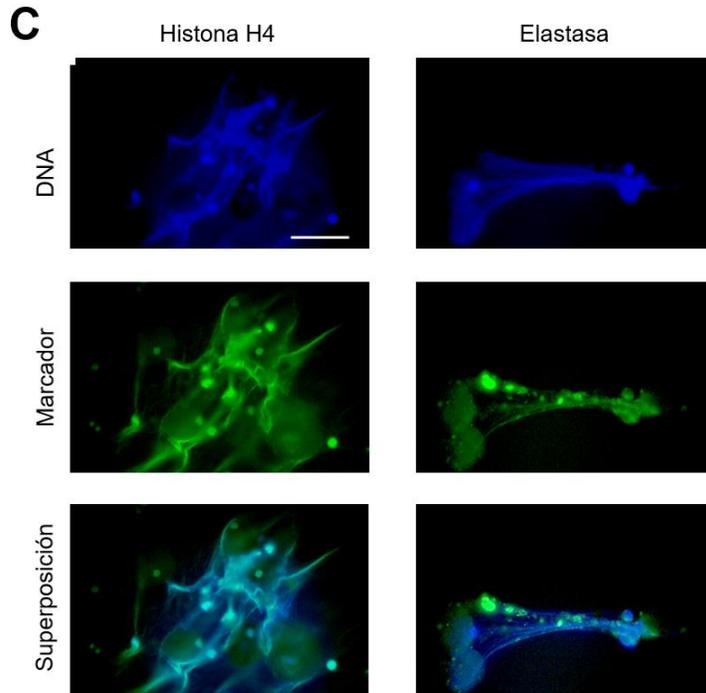
## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Los trofozoítos de *E. histolytica* inducen NETosis de una forma dosis dependiente**

La liberación de NET se evaluó utilizando diferentes proporciones de trofozoíto:neutrófilo. Como se observa en la Figura 7A, los trofozoítos inducen la liberación de NET en una forma dosis dependiente utilizando las proporciones 1:100 a 1:20. La cantidad máxima de DNA liberado se detectó usando una proporción 1:20 debido a que no se observaron diferencias significativas con respecto a la proporción 1:10 ni respecto a los controles de PMA y A23187. La liberación de NET se confirmó mediante la detección de MPO por

inmunofluorescencia. En la figura 7B se aprecia que los neutrófilos no estimulados poseen su núcleo condensado y multilobulado, mientras que los controles positivos de PMA y A23187 inducen la descondensación nuclear y la liberación de fibras de DNA que colocalizan con la MPO. Por otro lado, los trofozoítos de *E. histolytica* inducen NET nubosas con una distribución heterogénea de la MPO. Para garantizar que las estructuras observadas correspondieran a NET, también se realizó la detección de NE y de la histona H4 acetilada observando que ambos marcadores colocalizan con el DNA liberado como respuesta a los trofozoítos (Figura 7C).

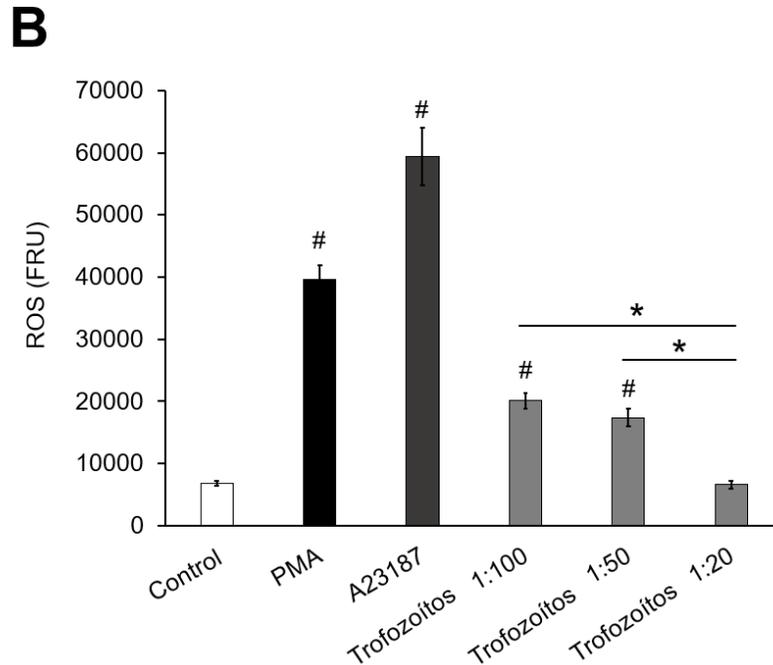
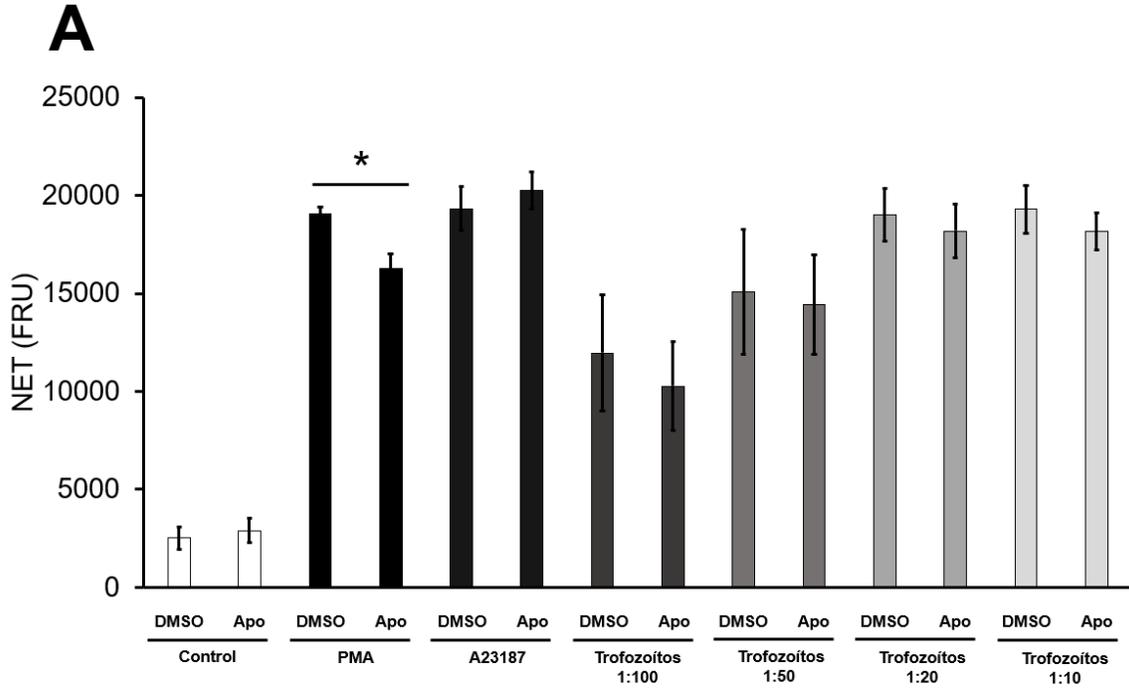




**Figura 7. *E. histolytica* induce NETosis en neutrófilos humanos de una forma dosis dependiente.** (A) Los neutrófilos humanos ( $1 \times 10^5$ ) se cultivaron con los trofozoítos de *E. histolytica* en las proporciones trofozoíto:neutrófilo 1:100, 1:50, 1:20 y 1:10 en medio RPMI-1640 adicionado con FBS (5%) y SYTOX®Green. El PMA (50 nM) y el A23187 (10  $\mu$ M) se usaron como controles positivos. La fluorescencia se leyó a las 4 h de incubación. La cantidad de NET está expresada en unidades de fluorescencia relativa (UFR). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , #  $p < 0.001$  respecto al valor de fluorescencia del control. (B) Los neutrófilos ( $2 \times 10^5$ ) se estimularon con PMA (50 nM), A23187 (10  $\mu$ M) o trofozoítos de *E. histolytica* ( $1 \times 10^4$ ) durante 4 h. Después de la fijación, las células se marcaron utilizando un anticuerpo primario anti-MPO seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a FITC. El DNA fue contrateñido con DAPI. Los recuadros del extremo derecho son ampliaciones de las superposiciones en donde se aprecian con mayor detalle los núcleos condensados de los neutrófilos control (cabeza de flecha roja), los núcleos descondensados en los tratamientos (cabezas de flecha moradas) y las hebras de DNA extracelular (flechas blancas). Las imágenes se obtuvieron usando un aumento de 40x. La barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m. (C) Los neutrófilos ( $2 \times 10^5$ ) se cocultivaron con trofozoítos de *E. histolytica* ( $1 \times 10^4$ ) durante 4 h. Las células se fijaron y la inmunofluorescencia se realizó usando los anticuerpos primarios anti-NE y anti-histona H4 acetilada seguida de los anticuerpos secundarios anti-ratón FITC (para NE) y anti-conejo TRITC (para la histona). El DNA se tiñó con DAPI. Las imágenes se obtuvieron usando un aumento de 100x. La barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m.

## **7.2 La NETosis inducida por *E. histolytica* parece ocurrir de forma independiente de las ROS generadas por NOX2**

Para inhibir la actividad de NOX2 se utilizó la apocinina, una molécula que penetra en las células y se oxida por acción de la MPO formando un homodímero con la capacidad de evitar el ensamblaje de NOX2 al bloquear la translocación de la subunidad p47<sup>phox</sup> hacia las subunidades membranales (Stefanska y Pawliczak, 2008). Como se observa en la figura 8A, la apocinina redujo de manera significativa la cantidad de NET liberada por los neutrófilos estimulados con PMA, mientras que aquella inducida por el A23187 no se vio afectada, tal y como era esperado (Figura 8A). Por otro lado, la liberación de NET inducida por los trofozoítos no se redujo por acción de la apocinina en ninguna de las proporciones trofozoíto:neutrófilo utilizadas, sugiriendo que este proceso ocurre independientemente de las ROS generadas por NOX2. Además, como se observa en la figura 8B, el estallido respiratorio de los neutrófilos se suprimió completamente por los trofozoítos de *E. histolytica* usando la relación 1:20, mientras que se detectó la producción de ROS en proporciones menores. Estos datos sugieren que la cantidad de NET liberada en respuesta a los trofozoítos ocurre independientemente de la actividad de NOX2 al usar una proporción trofozoíto:neutrófilo de 1:20, sin embargo, no se descarta la participación de las ROS derivadas de NOX2 al usar proporciones menores debido a que el estallido respiratorio no es suprimido completamente.

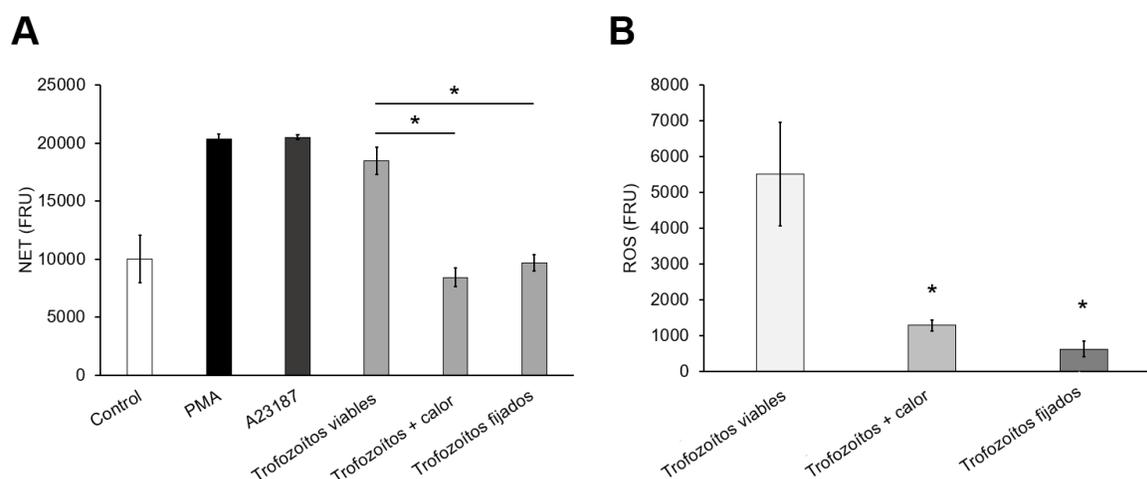


**Figura 8. La NETosis inducida por los trofozoítos parece ocurrir de forma independiente de NOX2.** (A) Los neutrófilos ( $1 \times 10^5$ ) se pretrataron con apocinina ( $400 \mu\text{M}$ ; Apo) o DMSO por 30 min. Las células se colocaron en medio RPMI-1640 adicionado con 5% de FBS,  $500 \text{ nM}$  de SYTOX®Green y  $400 \mu\text{M}$  del inhibidor. Las células se estimularon con PMA ( $50 \text{ nM}$ ), A23187 ( $10 \mu\text{M}$ ) o trofozoítos viables de *E. histolytica* (proporciones 1:100, 1:50, 1:20 y 1:10. La fluorescencia se leyó a las 4 h. (B) Los neutrófilos ( $1 \times 10^5$ ) se trataron con  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , se transfirieron a medio RPMI-1640 adicionado con 5% de FBS y se estimularon con PMA ( $50 \text{ nM}$ ), A23187 ( $10 \mu\text{M}$ ) o trofozoítos de *E. histolytica* en las proporciones 1:100, 1:50 y 1:20. La

fluorescencia se leyó después de 1 h de incubación. Las cantidades de NET y ROS se expresan como unidades de fluorescencia relativa (UFR). Los experimentos se realizaron 3 veces por triplicado. \* $p < 0.0001$ , #  $p < 0.001$  respecto al control.

### 7.3 Los trofozoítos muertos no inducen la liberación de NET y contienen una escasa cantidad de ROS

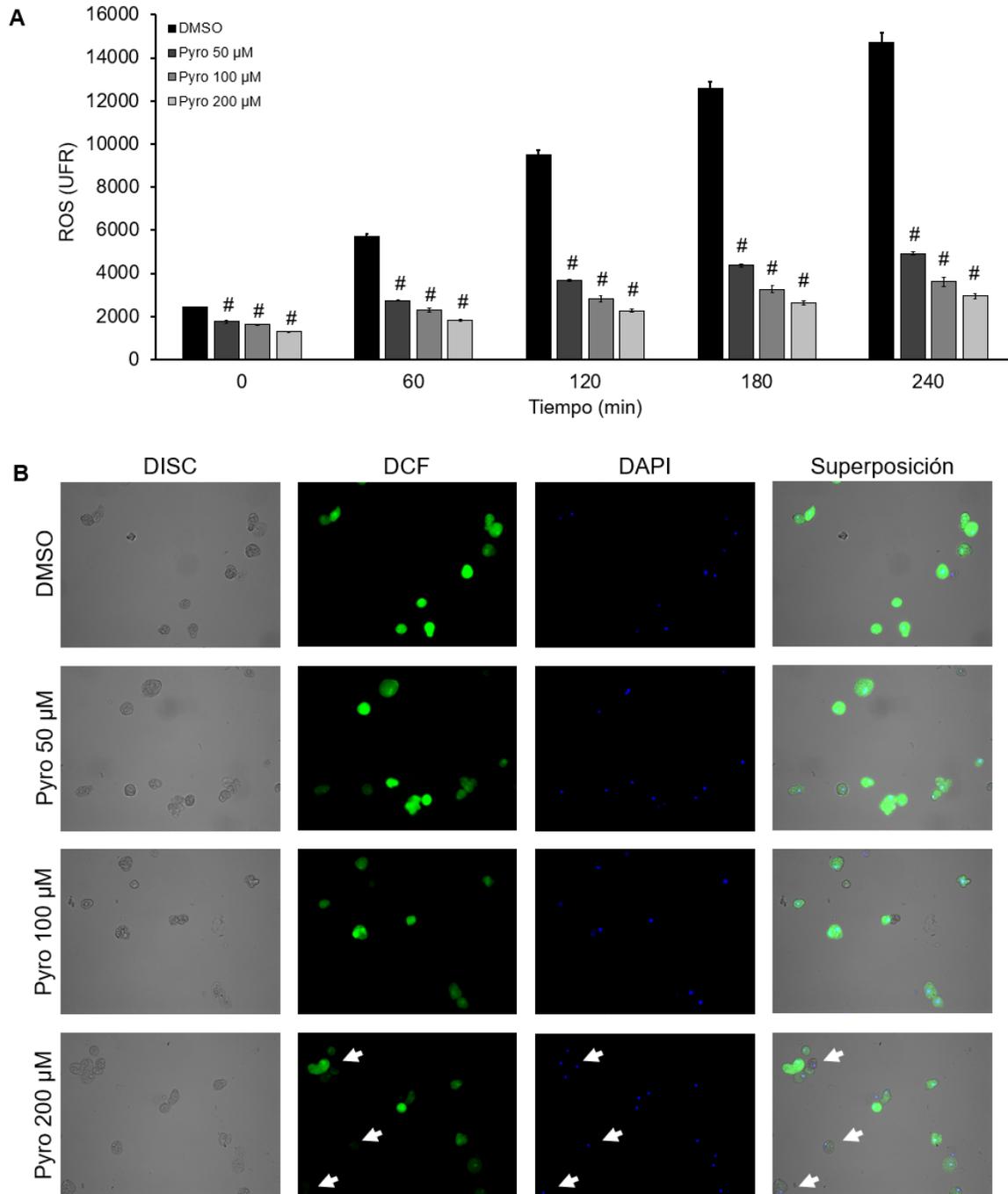
En la figura 9A se observa que los trofozoítos muertos por calor o fijados con formaldehído no inducen la liberación de NET en contraposición con las amibas viables en una proporción trofozoíto:neutrófilo de 1:20, las cuales inducen la liberación de NET en una cantidad similar a los controles positivos PMA y A23187. Este resultado sugiere que se requiere un producto del metabolismo activo del trofozoíto para la inducción del fenómeno. De este modo se comenzó a explorar la posibilidad de que las ROS provenientes de los trofozoítos desencadenaran la liberación de NET. Como se aprecia en la figura 9B, los trofozoítos muertos por ambas metodologías poseen una disminución significativa en la cantidad de ROS detectadas con el indicador H<sub>2</sub>DCFDA respecto a los trofozoítos viables.



**Figura 9. Los trofozoítos muertos de *E. histolytica* no inducen NETosis y contienen menos ROS.** (A) Los neutrófilos ( $1 \times 10^5$ ) se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 5% y adicionado con SYTOX®Green (500 nM). Los leucocitos se estimularon con PMA (50 nM), A23187 (10  $\mu$ M),  $5 \times 10^3$  trofozoítos viables, fijados o muertos por calor. La fluorescencia se leyó a las 4 h de incubación. (B) Los trofozoítos ( $5 \times 10^3$ ) viables, fijados o muertos por calor se pretrataron con H<sub>2</sub>DCFDA por 1 h y posteriormente se leyó la fluorescencia. Las cantidades de NET y ROS son expresadas como unidades de fluorescencia relativa (UFR). Los experimentos se realizaron 3 veces por triplicado. \* $p < 0.0001$ .

#### **7.4 El pirocatecol reduce las ROS generadas por los trofozoítos viables**

De acuerdo con los resultados anteriores, se decidió disminuir las ROS de los trofozoítos sin alterar su viabilidad usando pirocatecol. El pirocatecol posee actividad pepenadora de ROS al reaccionar con peróxido de hidrógeno y radicales libres oxidándose y formar benzoquinona (Zafar et al., 2016), sin embargo, se propone que posee otra actividad pepenadora al quelar iones  $Fe^{2+}$  impidiendo que se lleve a cabo la reacción de Fenton (Perron y Brumaghim, 2009) y reduciendo la formación del radical hidroxilo. Las ROS se detectaron utilizando  $H_2DCFDA$ , un indicador de ROS el cual atraviesa la membrana citoplasmática y reacciona con las esterasas intracelulares removiendo sus grupos acetado evitando su salida de la célula (Ng y Ooi, 2021). Este compuesto emite fluorescencia verde cuando es oxidado por diversas ROS, pero principalmente por radical hidroxilo, radical peroxilo, y el anión peroxinitrito, sin embargo, puede utilizarse para detectar peróxido de hidrógeno indirectamente ya que su presencia es necesaria para la formación del anion hidroxilo (Murphy et al., 2022). En la Figura 10A se observa que el pretratamiento de los trofozoítos con pirocatecol durante 1.5 h reduce de manera significativa las ROS detectadas en los trofozoítos de una forma dosis dependiente. Además, en la Figura 10B se observa que los trofozoítos expuestos al  $H_2DCFDA$  exhiben una fluorescencia verde intensa en condiciones basales (altos niveles de ROS), mientras que en los trofozoítos tratados con pirocatecol la fluorescencia se reduce gradualmente de acuerdo con la dosis, incluso, algunos trofozoítos tratados con pirocatecol 200  $\mu M$  no exhiben fluorescencia alguna.

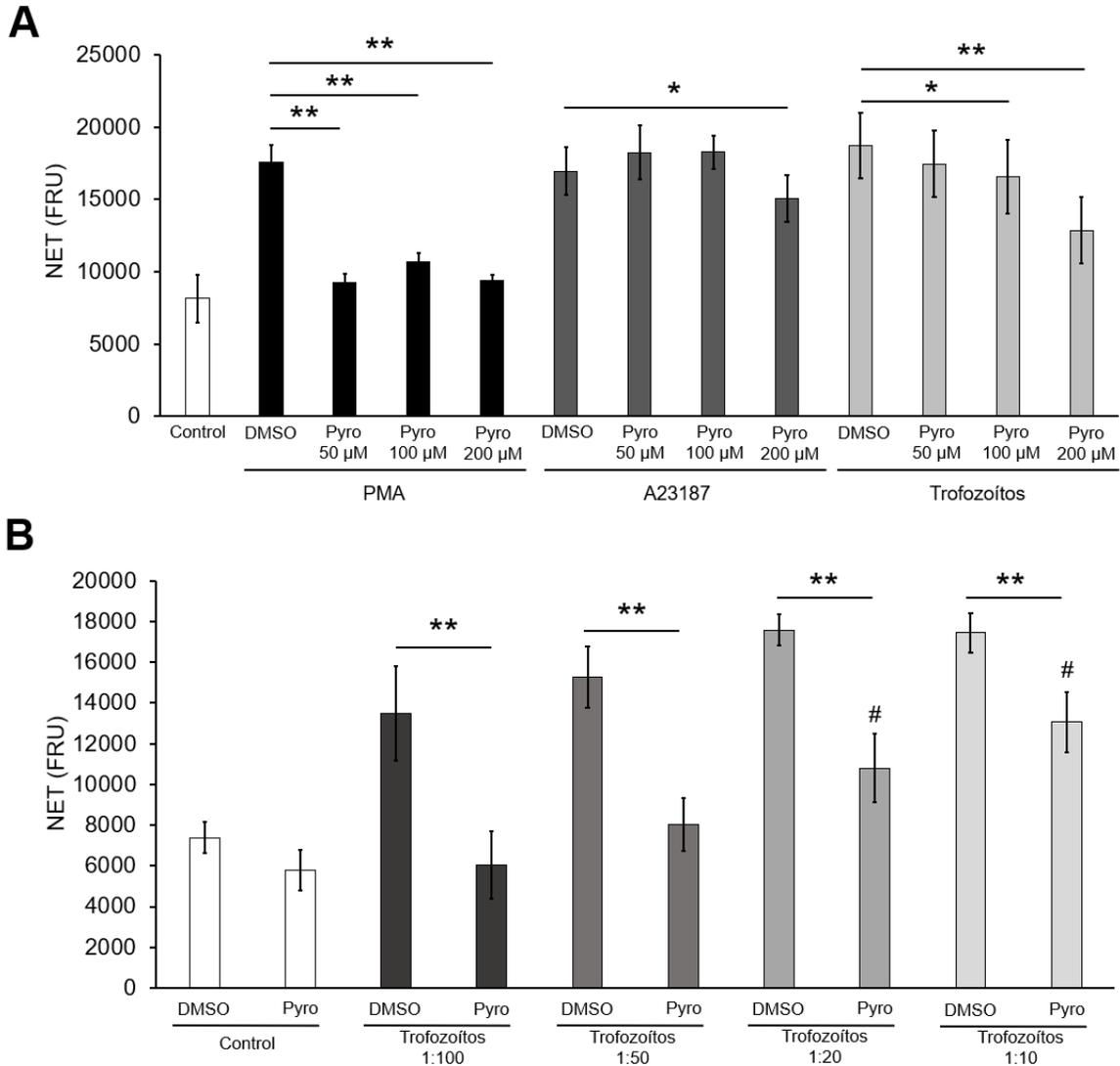


**Figura 10. El pirocatecol reduce las ROS generadas por los trofozoítos viables de *E. histolytica*.** Los trofozoítos se trataron con DMSO o pirocatecol (Pyro) usando las concentraciones de 50, 100 y 200 µM y después se marcaron con el indicador H<sub>2</sub>DCFDA. Los trofozoítos se incubaron por una hora adicional y posteriormente se resuspendieron en medio RPMI-1640 adicionado de FBS al 5%. La fluorescencia de la 2',7'-dichlorofluoresceína (DCF) se midió cada hora durante 4 h (A), o bien, los trofozoítos se fijaron y contratiñeron con DAPI para su observación microscópica (B); las flechas señalan a los trofozoítos tratados con pirocatecol

que ya no emiten fluorescencia. La cantidad de ROS se expresa en unidades de fluorescencia relativa (UFR). Los experimentos se realizaron tres veces por triplicado. #  $p < 0.01$  respecto al control.

## **7.5 Los trofozoítos con bajos niveles de ROS inducen una menor liberación de NET**

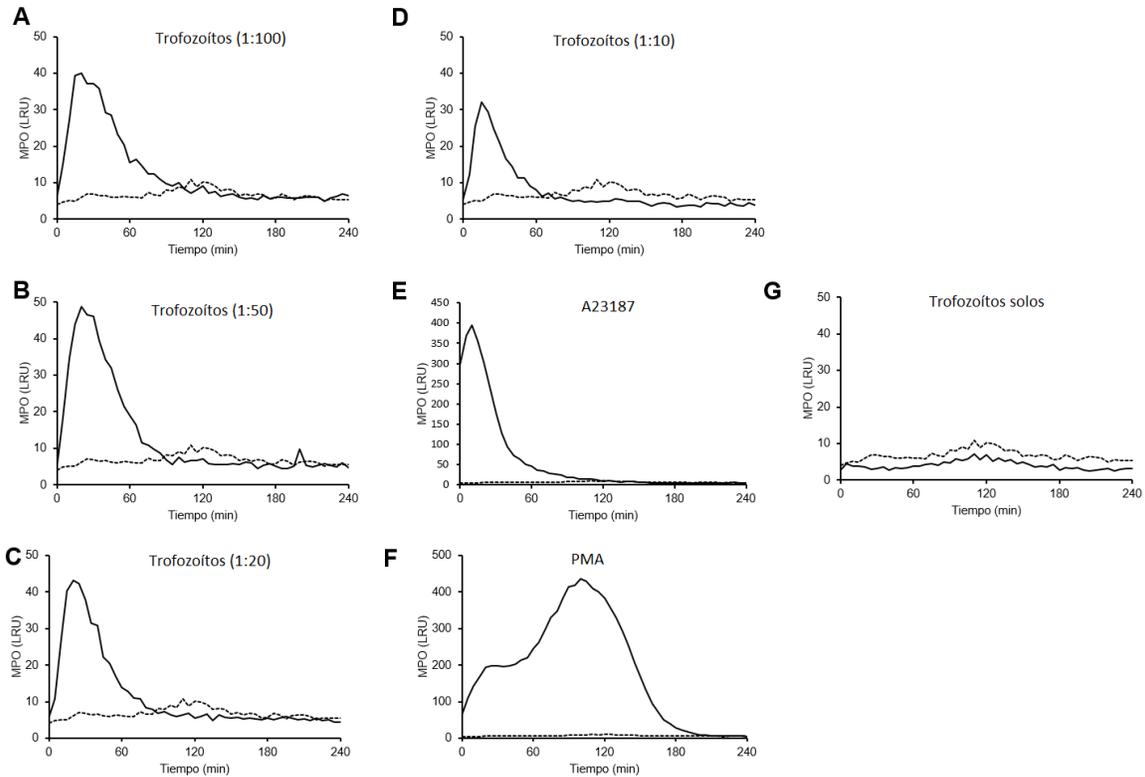
Una vez que se demostró que el pirocatecol reduce las ROS producidas por el trofozoíto, se decidió observar el efecto de estos trofozoítos sobre la liberación de NET. Se puede observar que los trofozoítos reducidas en ROS inducen una menor liberación de NET al compararlas con aquellas que se trataron con el vehículo DMSO (Figura 11A) y esta reducción fue estadísticamente significativa cuando se usó una concentración de pirocatecol de 100 y 200  $\mu\text{M}$ . Además, el pirocatecol presente en el medio inhibió por completo la liberación de NET inducida por PMA en todas las concentraciones utilizadas. Sorpresivamente, el pirocatecol a 200  $\mu\text{M}$  disminuyó significativamente la cantidad de NET utilizando A23187, pero concentraciones menores no tuvieron este efecto. La participación de las ROS de los trofozoítos en la liberación de NET fue más evidente cuando se utilizaron menores proporciones de trofozoíto:neutrófilo. Como se observa en la figura 11B los trofozoítos pretratados con pirocatecol indujeron la liberación de NET de una forma dosis dependiente en comparación con los trofozoítos tratados con el vehículo DMSO. Incluso, los trofozoítos perdieron su capacidad de inducir la liberación de NET en las proporciones 1:50 y 1:100.



**Figura 11. Los trofozoitos reducidos en ROS inducen una menor liberación de NET.** (A) Los neutrófilos ( $1 \times 10^5$ ) se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 5% y adicionado con SYTOX®Green (500 nM) y pirocatecol (Pyro; 50, 100 o 200  $\mu$ M). Los leucocitos se estimularon con PMA (50 nM), A23187 (10  $\mu$ M) o  $5 \times 10^3$  trofozoitos (proporción 1:100) pretratados con pirocatecol (de acuerdo con la concentración presente en el medio). La fluorescencia se leyó a las 4 h de incubación. (B) Los neutrófilos ( $1 \times 10^5$ ) se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 5% y adicionado con SYTOX®Green (500 nM) y pirocatecol (200  $\mu$ M). Los leucocitos se estimularon con trofozoitos pretratados con pirocatecol (200  $\mu$ M) o con el vehículo DMSO en las proporciones 1:100, 1:50, 1:20 y 1:10. La fluorescencia se leyó a las 4 h de incubación. La cantidad de NET se expresa como unidades de fluorescencia relativa (UFR). Los experimentos se realizaron 3 veces por triplicado. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.0001$ , # $p < 0.05$  respecto al control.

## 7.6 Se detecta actividad de MPO durante la interacción neutrófilo-trofozoíto

La actividad de MPO se ha relacionado con algunos mecanismos de NETosis, fue por ello por lo que se decidió detectar su actividad durante la interacción del neutrófilo con los trofozoítos. La MPO es una enzima tetramérica que produce ácido hipocloroso (HClO) a partir del peróxido de hidrógeno y ion cloruro durante el estallido oxidativo de los neutrófilos (Van Der Veen et al., 2009). Para detectar su actividad se utilizó luminol, una molécula que puede oxidarse produciendo luz (quimioluminiscencia) de forma directa o indirectamente por el HClO producido por la MPO, o bien, la MPO puede catalizar su oxidación utilizando como cosustrato al anión superóxido. Además, Gross et al. (2009) reportaron que su luminiscencia depende substancialmente de la actividad de MPO en modelos *in vitro* e *in vivo*. Durante el contacto de los neutrófilos con los trofozoítos, se detectó actividad de quimioluminiscencia del luminol, que es un indicador indirecto de la actividad de mieloperoxidasa (MPO) en los neutrófilos por producción de HClO, y esta actividad estuvo presente en todas las proporciones trofozoíto:neutrófilo probadas (Figura 12). El patrón de actividad fue el mismo independientemente de la cantidad de trofozoítos: la actividad se incrementa rápidamente durante los primeros minutos de interacción hasta alcanzar un máximo a los 20 min aproximadamente, posteriormente, decrece gradualmente hasta desaparecer por completo a los 90 min (Figuras 12A-D). El A23187 produjo un efecto similar observándose una lectura máxima a los 10 min la cual decayó hasta desaparecer por completo a los 100 min (Figura 12). Por otro lado, al utilizar PMA se indujo una actividad gradual durante los primeros 20 min alcanzando un valor constante durante 25 min más, posteriormente la actividad se incrementó nuevamente hasta alcanzar su valor máximo a los 100 min para disminuir gradualmente hasta desaparecer a los 200 min (Figura 12F). Finalmente, es importante notar que los trofozoítos no exhiben actividad de MPO por sí mismas (Figura 12G).



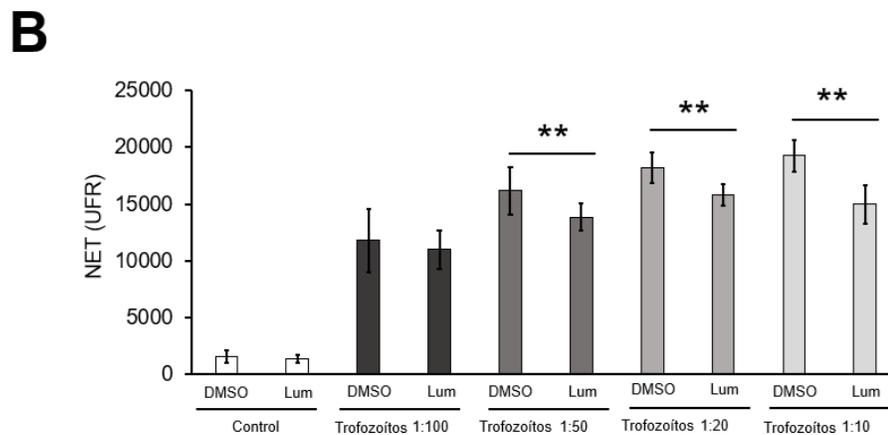
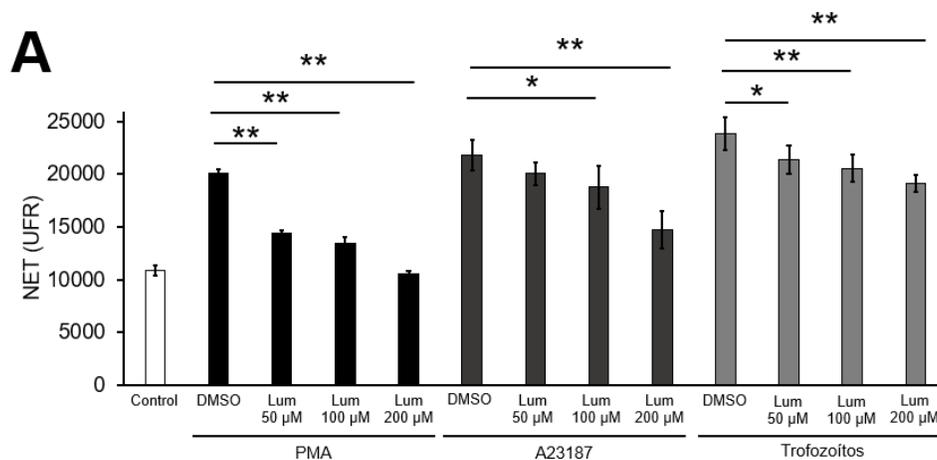
**Figura 12. Determinación de actividad de MPO durante la interacción de los neutrófilos con los trofozoítos.** Los neutrófilos ( $1 \times 10^5$ ) se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 5% y adicionado con luminol ( $200 \mu\text{M}$ ). Los leucocitos se estimularon con trofozoítos viables de *E. histolytica* a las proporciones 1:100 (A), 1:50 (B), 1:20 (C) y 1:10 (D), así como A23187 (E) y PMA (F). Los trofozoítos solos se utilizaron como testigo (G). Las líneas negras sólidas representan la actividad de MPO (reportada como unidades de luminiscencia relativa, LRU) después de la estimulación y las líneas punteadas representan la actividad de MPO en ausencia de estímulo (misma línea para todas las gráficas). Los experimentos se realizaron 3 veces por triplicado.

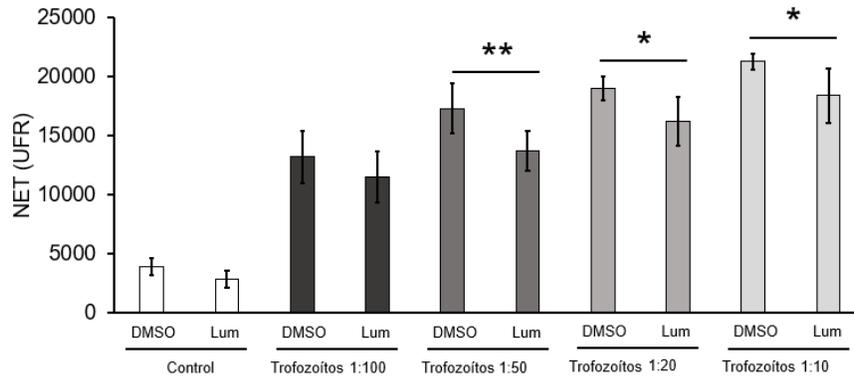
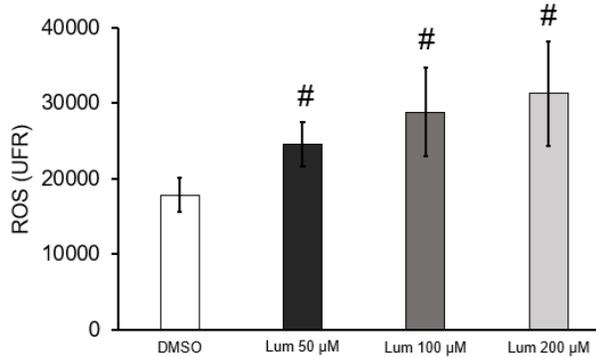
### 7.7 La actividad de MPO es necesaria para la NETosis inducida por *E. histolytica*

El luminol también ha sido empleado como un pepenador del HClO derivado de la MPO (Gross et al., 2009), por lo que en este trabajo se analizó su efecto sobre la liberación de NET. Como se observa en la Figura 13A este compuesto disminuye la liberación de NET inducida por el trofozoíto de una forma dosis dependiente, además, se observaron resultados similares al utilizar PMA y A23187 como estímulos. Cuando este experimento se realizó utilizando ahora diferentes

proporciones trofozoíto:neutrófilo, el luminol (200  $\mu$ M) redujo la liberación de NET en las proporciones 1:50, 1:20 y 1:10, sin embargo, no se observaron diferencias al utilizar la proporción 1:100 (Figura 13B).

Para confirmar que este efecto se debió a la reducción del HClO derivado de MPO proveniente de los neutrófilos y no de otra ROS derivado del trofozoíto, éstos se pretrataron con luminol durante 1.5 h y después se utilizaron para inducir la liberación de NET. Sorpresivamente, se observó una disminución en la liberación de NET similar a la observada en el experimento anterior (Figura 13C). Por esta razón se determinó la producción de ROS en los trofozoítos pretratados y se encontró que el luminol incrementa la cantidad de ROS en los trofozoítos (Figura 13D).

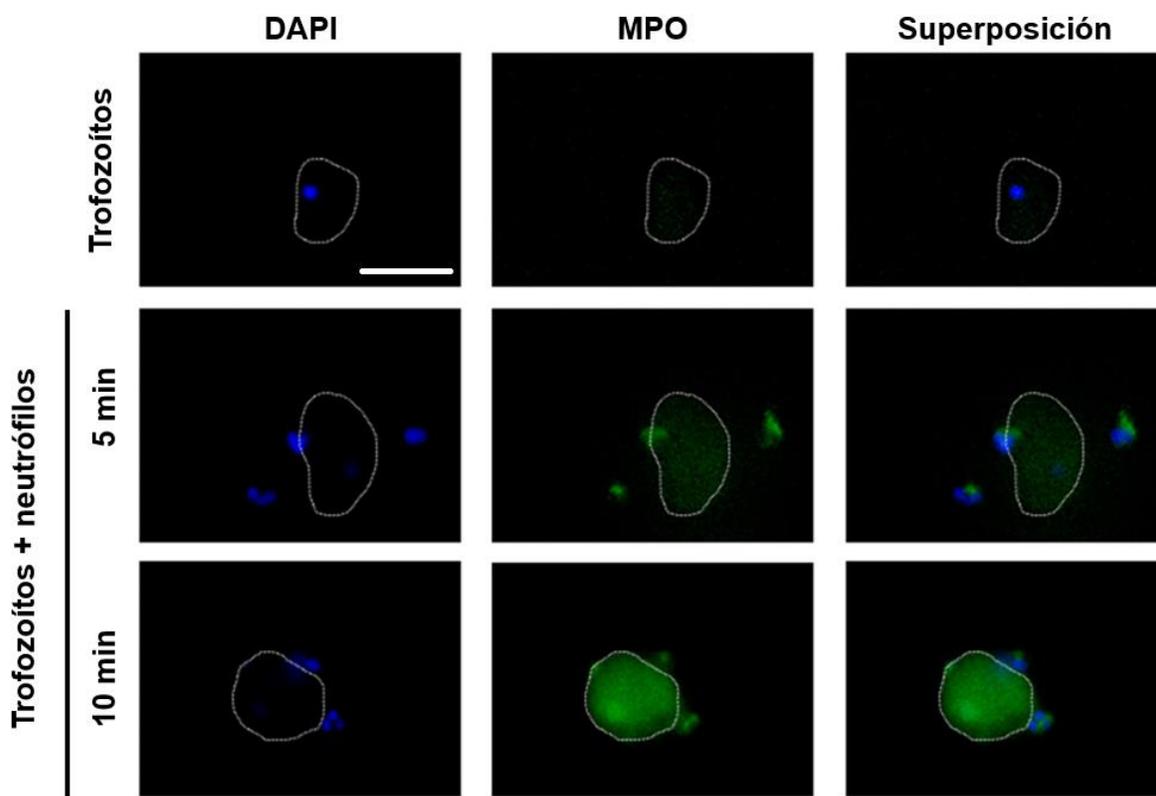


**C****D**

**Figura 13. La actividad de MPO se requiere para la NETosis inducida por los trofozoítos de *E. histolytica*.** (A) Los neutrófilos ( $1 \times 10^5$ ) se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 5% y adicionado con SYTOX®Green (500 nM), luminol (Lum, 50, 100 y 200 µM) o el vehículo DMSO. Los leucocitos se estimularon con PMA (50 nM), A23187 (10 µM),  $5 \times 10^3$  trofozoítos viables. La fluorescencia se leyó a las 4 h de incubación. (B) Los neutrófilos ( $1 \times 10^5$ ) se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 5% y adicionado con SYTOX®Green (500 nM), luminol (200 µM) o el vehículo DMSO. Los leucocitos se estimularon con trofozoítos viables en las proporciones 1:100, 1:50, 1:20 y 1:10. (C) Los neutrófilos ( $1 \times 10^5$ ) se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 5% y adicionado con SYTOX®Green (500 nM), luminol (200 µM) o el vehículo DMSO. Los leucocitos se estimularon con PMA (50 nM), A23187 (10 µM) o trofozoítos pretratados con luminol (200 µM) en las proporciones 1:100, 1:50, 1:20 y 1:10. La fluorescencia se leyó a las 4 h de incubación. (D) Los trofozoítos se trataron con el vehículo DMSO o con luminol a las concentraciones 50, 100 o 200 µM durante 30 min, posteriormente se adicionó el indicador H2DCFDA (100 µM). Las células se incubaron por una hora extra y después de este tiempo se transfirieron a medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 5%. Se tomaron  $1 \times 10^5$  trofozoítos, se sembraron y se midió la fluorescencia. Las cantidades de NET y ROS son expresadas como unidades de fluorescencia relativa (UFR). Los experimentos se realizaron 3 veces por triplicado. \* $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.001$ , # $p < 0.0001$  respecto al control.

## **7.8 La MPO se detecta en la superficie de los trofozoítos después de la interacción temprana con los neutrófilos**

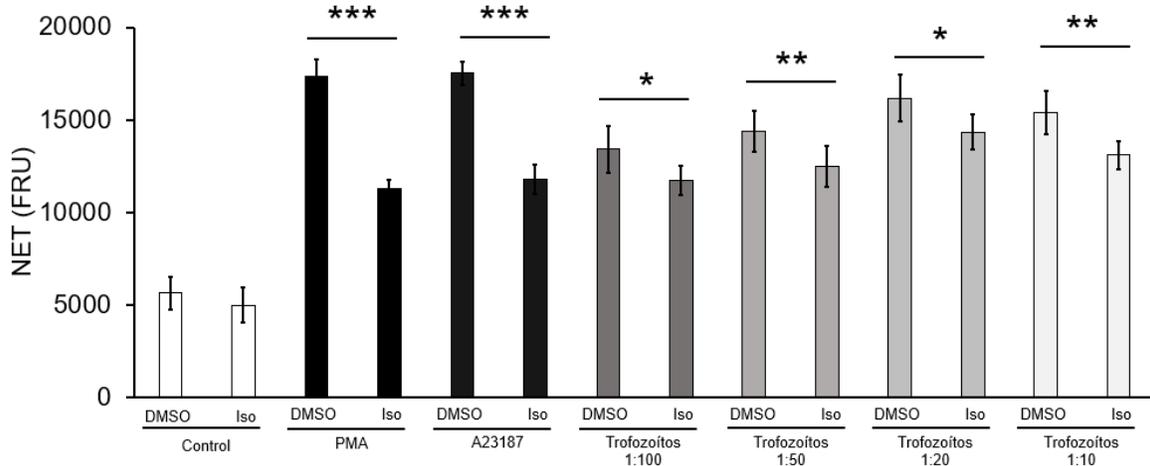
Los resultados anteriores hicieron plantear la posibilidad de que las ROS se transfieren entre ambas células durante tiempos cortos de interacción. Debido a que las ROS no se detectaron en los neutrófilos estimulados con los trofozoítos en proporciones 1:20, pero la actividad de MPO se detectó independientemente de la proporción empleada, se exploró la posibilidad de que la MPO se transfiriera a los trofozoítos. En la figura 14 se observa que en los trofozoítos solos no se detecta MPO mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo específico contra esta enzima ni tampoco se detecta autofluorescencia. En cambio, el anticuerpo se unió a la superficie de los trofozoítos después de 5 min de interacción con los neutrófilos y cubrieron completamente a los trofozoítos después de 10 min de contacto, sugiriendo que la MPO se transfirió rápidamente desde los neutrófilos hacia los trofozoítos.



**Figura 14. La MPO se transfiere rápidamente desde los neutrófilos hacia los trofozoitos.** (A) Los neutrófilos ( $2 \times 10^5$ ) se cocultivaron con trofozoitos de *E. histolytica* ( $1 \times 10^4$ ) durante 5 o 10 min. Los trofozoitos solos se utilizaron como control. Después de la fijación, las células se marcaron utilizando un anticuerpo primario anti-MPO seguido de un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a FITC. El DNA fue contrateñido con DAPI. La línea punteada marca el contorno de los trofozoitos. Las imágenes se obtuvieron con un aumento de 100x. La barra de escala equivale a 50  $\mu\text{m}$ . Las imágenes que se muestran son representativas de 3 ensayos.

### 7.9 La inhibición de la actividad de MPO extracelular reduce la NETosis inducida por los trofozoitos

Para determinar si la MPO detectada en la superficie de los trofozoitos está involucrada en la NETosis se decidió utilizar isoluminol como pepenador extracelular, el cual posee un grupo amino que evita su entrada a las células. En contraste con el luminol, el isoluminol disminuyó la cantidad de NET en todas las proporciones trofozoito:neutrófilo empleada (1:100, 1:50, 1:20 y 1:10) mostrando diferencia significativa con su respectivo control (Figura 15). El isoluminol también redujo la cantidad de NET liberada en respuesta al PMA y A23187, pero tampoco la redujo completamente.

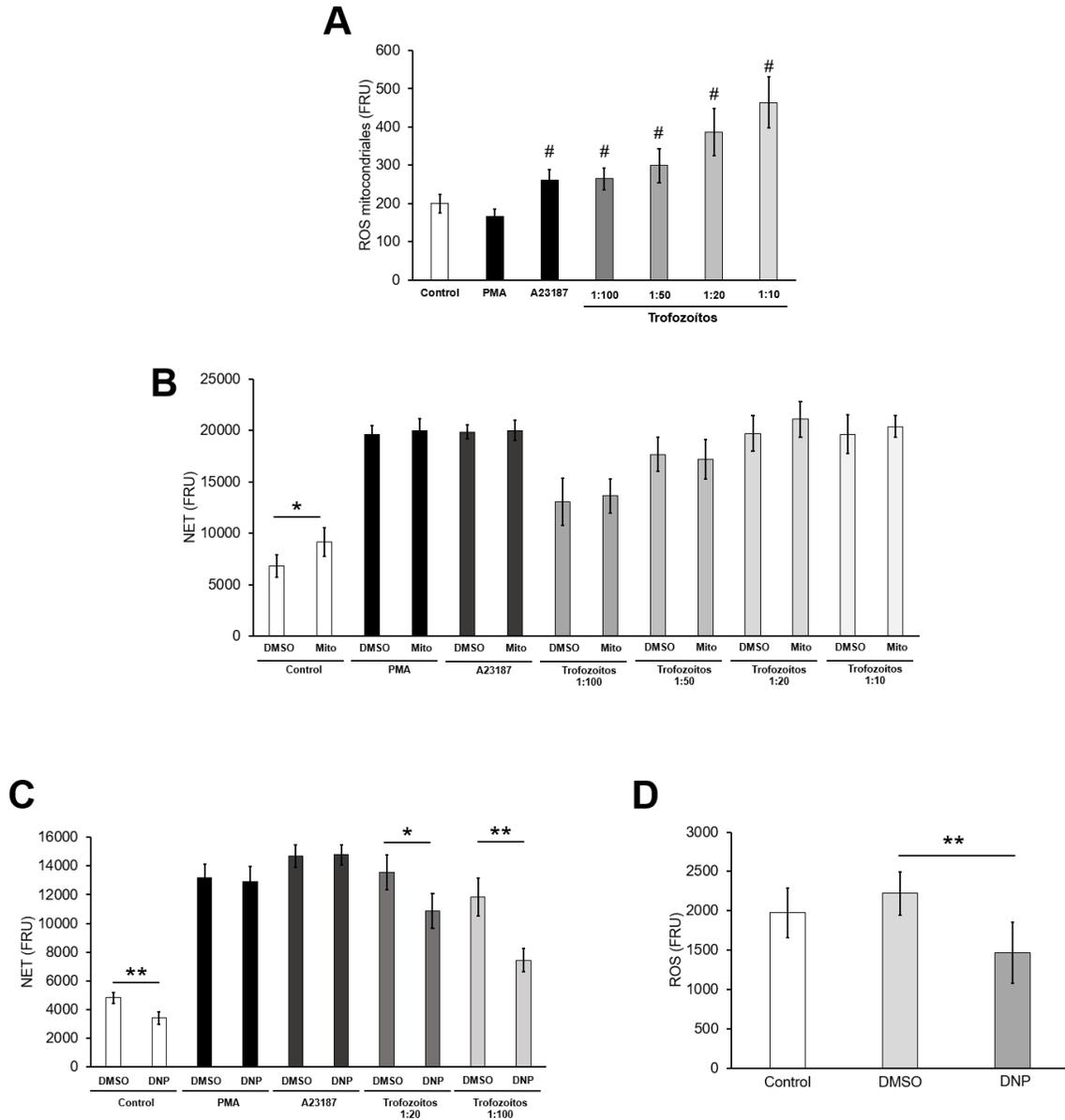


**Figura 15. La actividad de MPO se requiere para la NETosis inducida por los trofozoítos de *E. histolytica*.** Los neutrófilos ( $1 \times 10^5$ ) se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 5% y adicionado con SYTOX®Green (500 nM), isoluminol (Iso, 200  $\mu$ M) o el vehículo DMSO. Los leucocitos se estimularon con PMA (50 nM), A23187 (10  $\mu$ M) o trofozoítos viables en relación 1:100, 1:50, 1:20 y 1:10. La fluorescencia se leyó a las 4 h de incubación. La cantidad de NET esta expresada en unidades de fluorescencia relativa (UFR). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### 7.10 Las ROS de origen mitocondrial no participan en la NETosis inducida por *E. histolytica*

También se decidió explorar la posibilidad de que las ROS de origen mitocondrial participaran en la liberación de NET inducida por los trofozoítos. Primero se evaluó la producción de ROS mitocondriales de los neutrófilos por pretratamiento con MitoSOX™Red, el cual tiene un grupo trifenilfosfonio que le permite atravesar las membranas lipídicas y acumularse en la mitocondria, sumado al grupo dihidroetidio que es oxidado específicamente por el anión superóxido (Mailloux, 2015). Este compuesto posteriormente se une al DNA mitocondrial emitiendo fluorescencia de color rojo. Como se esperaba, el PMA no indujo la producción de ROS mitocondriales, contraria a la estimulación con el ionóforo A23187 (Figura 16A). Por otro lado, los trofozoítos indujeron la producción de ROS mitocondriales de una forma dosis dependiente (Figura 16A). Para determinar si estas moléculas eran necesarias para la liberación de las NET se utilizó MitoTEMPO, un pepenador específico del anión superóxido. Este compuesto posee el grupo nitróxido de piperidina con acción antioxidante específica por el anión superóxido

y, además, también posee el grupo trifenilfosfonio para acumularse en la mitocondria (Kalyanaraman et al., 2018). Como se observa en la Figura 16B el MitoTEMPO no produjo una reducción de la cantidad de NET liberada en respuesta al PMA, A23187 ni por ninguna de las proporciones trofozoíto:neutrófilo ensayada. Para verificar estos resultados se utilizó el dinitrofenol (DNP), un agente desacoplante de la cadena respiratoria mitocondrial, el cual ha demostrado que reduce la cantidad de peróxido de hidrógeno producido por los complejos respiratorios (especialmente por el complejo I) al permitir un paso libre de los electrones a través de estos (Cadenas, 2018). En la Figura 16C se nota que la cantidad de NET liberada como respuesta al PMA y A23187 no se vio afectada por el DNP, sin embargo, la cantidad inducida por el trofozoíto se redujo de forma significativa utilizando las proporciones 1:20 y 1:100. Sin embargo, se observó que el DNP redujo significativamente las ROS generadas por los trofozoítos (Figura 16D). Estos datos juntos sugieren que las ROS mitocondriales no participan en el fenómeno.



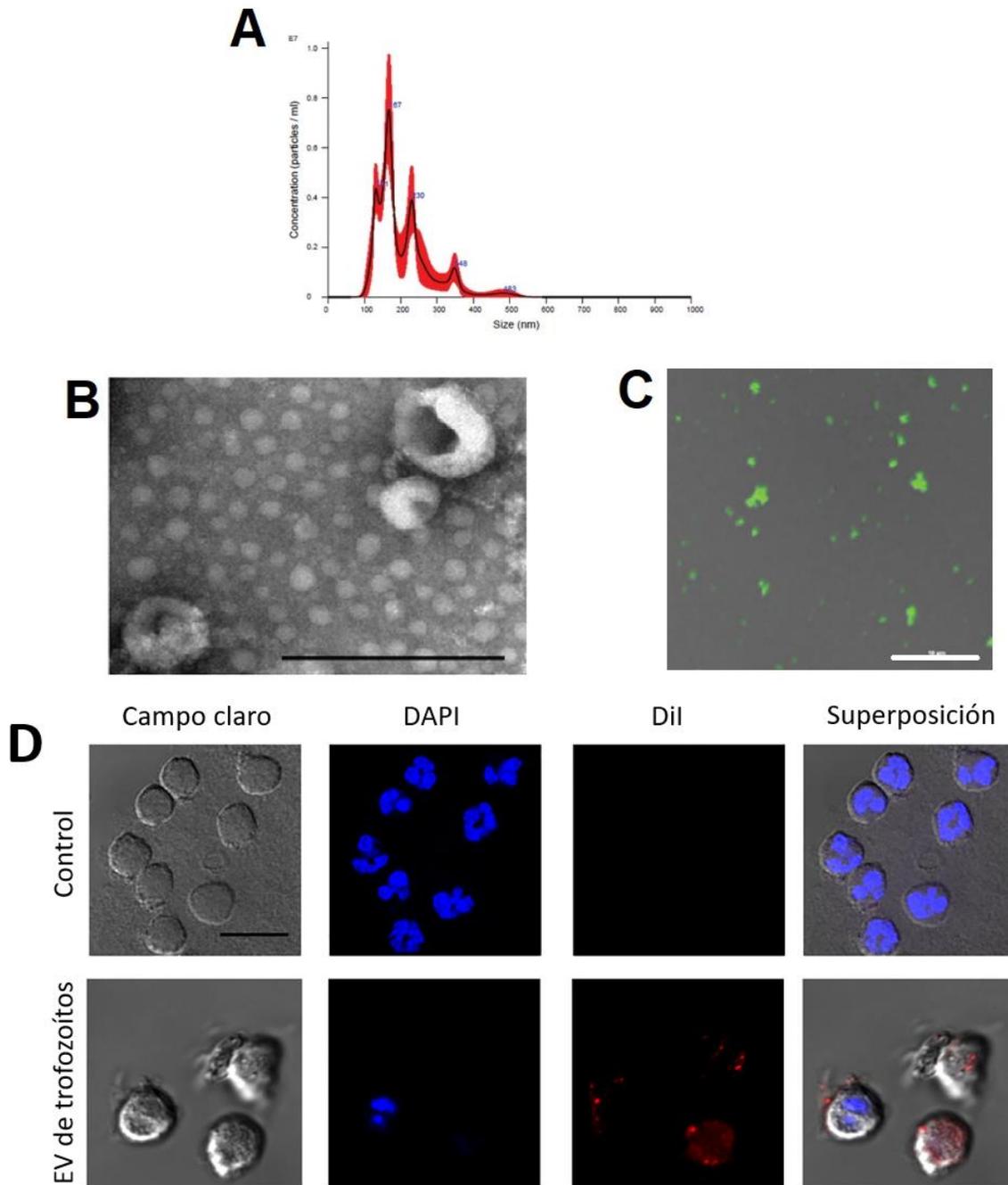
**Figura 16. Las ROS mitocondriales no son necesarias para la NETosis inducida por *E. histolytica*.** (A) Los neutrófilos ( $1 \times 10^5$ ) se marcaron con MitoSOX™Red y se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 5%. Los leucocitos se estimularon con PMA (50 nM), A23187 (10  $\mu$ M) o trofozoitos viables en relación 1:100, 1:50, 1:20 y 1:10. La fluorescencia se leyó a las 2 h de incubación. (B) Los neutrófilos ( $1 \times 10^5$ ) se pretrataron con MitoTEMPO (400  $\mu$ M) o DMSO por 30 min, posteriormente, se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 5% y adicionado con SYTOX®Green (500 nM). Los leucocitos se estimularon con PMA (50 nM), A23187 (10  $\mu$ M) o trofozoitos viables en relación 1:100, 1:50, 1:20 y 1:10. La fluorescencia se leyó a las 4 h de incubación. (C) Los neutrófilos ( $1 \times 10^5$ ) se pretrataron con DNP (200  $\mu$ M) o DMSO por 30 min, posteriormente, se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con FBS al 5% y adicionado con SYTOX®Green (500 nM). Los leucocitos se estimularon con PMA (50 nM), A23187 (10  $\mu$ M) o trofozoitos viables en relación 1:100 y 1:20. La fluorescencia se leyó a las 4 h de incubación. (D) Los trofozoitos se trataron con el vehículo DMSO o con DNP (200  $\mu$ M) durante 30 min, posteriormente se adicionó el indicador H<sub>2</sub>DCFDA (100  $\mu$ M). Las células se incubaron por una hora extra y después de este tiempo se transfirieron a medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 5%. Se tomaron  $1 \times 10^5$  trofozoitos, se sembraron y se midió la

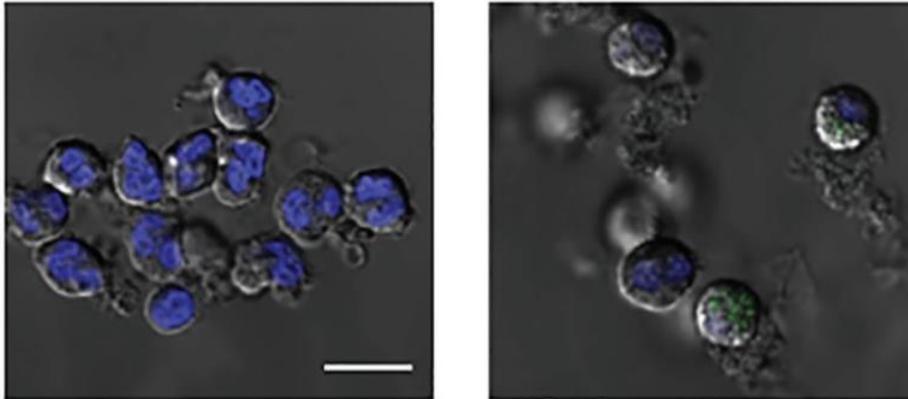
fluorescencia. Las cantidades de NET y ROS están expresadas en unidades de fluorescencia relativa (UFR). Los experimentos se realizaron 3 veces por triplicado. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , #  $p < 0.001$  respecto al control.

### **7.11 Las EV de los trofozoítos transportan ROS hacia los neutrófilos humanos**

Para tratar de establecer un mecanismo a través del cual las ROS producidas por los trofozoítos pudieran transportarse hacia los neutrófilos se decidió probar la participación de las EV en este proceso. Para ello se utilizó el equipo Nanosight NS3000 que mide la dispersión de luz dinámica en una solución a través de un láser, lo que se traduce en la medición del tamaño de las nanopartículas suspendidas en ella. En la figura 17A se muestra que las EV liberadas por los trofozoítos de *E. histolytica* tienen un tamaño heterogéneo que va desde los 50 hasta los 600 nm (Figura 17A), sin embargo, hubo un enriquecimiento de partículas con un diámetro de 167 nm. Además, en el histograma también se observaron otros picos de partículas de tamaños de 141, 230, 348 y 483 nm. Para corroborar que estas partículas detectadas en el sobrenadante correspondieran a EV y no a otro tipo de partículas se realizó una microscopía electrónica de transmisión. En la Figura 17B se aprecian que las nanopartículas aisladas tienen menos de 200 nm de tamaño y que su morfología es casi esférica con una hendidura central, lo cual corresponde con descripciones previas de EV observadas mediante la misma técnica (Jung y Mun, 2018). La identidad de las EV también fue verificada usando los colorantes DiO y Dil, los cuales son compuestos lipofílicos que se unen a las bicapas lipídicas emitiendo fluorescencia verde (DiO) o roja (Dil) (Cheng et al., 2014). Como se observa en la Figura 17C, las partículas obtenidas a partir de los trofozoítos y teñidas con DiO emiten fluorescencia verde, lo cual indica que están compuestas por membranas lipídicas. La interacción entre las EV y los neutrófilos humanos se evidencia en la Figura 17D en donde se observa que los neutrófilos cultivados en contacto con las EV teñidas con Dil muestran puntos de fluorescencia roja intensa asociados a la membrana citoplasmática y también en el citoplasma, indicando que las partículas interaccionan con la superficie de estas células, pero también son internalizadas. Este patrón de fluorescencia estuvo ausente en los neutrófilos control que se

trataron con el vehículo de las EV. Finalmente, la Figura 17E muestra que los neutrófilos en contacto con las EV marcadas con el indicador de ROS  $H_2DCFDA$  exhibieron pequeños puntos de fluorescencia verde detectados en el citoplasma y este patrón estuvo ausente en las células control tratadas únicamente con el vehículo. Esto último corresponde con el patrón de interacción descrito con anterioridad indicando que las EV que acarrean ROS son internalizadas.



**E****Control****Neutrófilos + EV**

**Figura 17. Las EV producidas por los trofozoítos de *E. histolytica* transportan ROS hacia los neutrófilos.** Las EV se obtuvieron a partir de  $7.5 \times 10^5$  trofozoítos cultivados en medio RPMI-1640 libre de suero. Después de recuperar el sobrenadante libre de células las EV se purificaron usando el reactivo *Total Exosome Isolation (from cell culture media)* y se analizaron en el equipo Nanosight NS3000 para determinar el tamaño a través del histograma (A). (B) Microscopía electrónica de transmisión de las EV. La barra de escala representa 200 nm. (C) Las EV se aislaron a partir del sobrenadante de cultivo de los trofozoítos y se tiñeron con el colorante DiO (dilución 1:10). Posteriormente la suspensión se colocó sobre una cama de agarosa de bajo punto de fusión para su visualización. La barra de escala representa 10  $\mu\text{m}$ . (D) Las EV provenientes de los trofozoítos se tiñeron con el colorante Dil (dilución 1:10) y se adicionaron a un cultivo de  $2 \times 10^5$  neutrófilos humanos. Después e 10 min de interacción las células se fijaron, se contratiñeron con DAPI y se montaron para su observación. La barra de escala representa 20  $\mu\text{m}$ . (E) Las EV (10  $\mu\text{g}$  de proteína) se marcaron usando  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  10  $\mu\text{M}$  y se pusieron en contacto con  $2 \times 10^5$  neutrófilos (Neutrófilos + EV). El cultivo se incubó por 30 min en la oscuridad, se contratiñó con DAPI, se fijó y posteriormente se montó para su observación al microscopio confocal. Como control se usaron células expuestas al vehículo. La barra de escala equivale a 20  $\mu\text{m}$ .

## 8. DISCUSIÓN

Anteriormente, hemos descrito que la NETosis inducida por *E. histolytica* ocurre por un mecanismo no convencional independiente de la actividad de NOX2, pero también es independiente de la participación de PAD4 (Ávila et al., 2016; Díaz-Godínez et al., 2018). En este proyecto se realizaron una serie de experimentos para continuar con la caracterización de la NETosis inducida por el trofozoíto y así determinar la existencia o no de una fuente de ROS.

En todos nuestros estudios previos de NETosis, los neutrófilos humanos se coincubaron con los trofozoítos en proporción 1:20 (Ávila et al., 2016; Díaz-Godínez et al., 2018, Fonseca et al., 2018; Fonseca et al., 2019). Aquí se demostró que esta es la relación a la cual se obtiene la mayor cantidad de NETs y que cantidades menores de trofozoítos (proporciones 1:50 y 1:100) también inducen la liberación de NET en una forma dosis dependiente. Estos datos apuntan a que *E. histolytica* es uno de los parásitos con mayor capacidad de inducir NET, debido a que otros protozoarios requieren grandes proporciones para lograrlo, por ejemplo, *Toxoplasma gondii* ha sido usado en relaciones 1:1, *Trypanosoma cruzi* 1:1 y diferentes especies del género *Leishmania* necesitan utilizarse en proporciones 10:1 o 1:1 (Guimarães-Costa et al., 2009; Abi-Abdallah et al., 2012; Rochael et al., 2015; Sousa-Rocha et al., 2015,). En contraposición, en este trabajo se observó que 1 trofozoíto por cada 100 neutrófilos es suficiente para que se lleve a cabo la NETosis. La razón exacta de este mecanismo requiere explorarse, pero el tamaño del patógeno puede estar relacionado pues *T. gondii*, *T. cruzi* y *Leishmania* no exceden los 30 µm, mientras que los trofozoítos de *E. histolytica* llegan a alcanzar hasta los 60 µm (Carrero et al., 2020). Mientras que los neutrófilos pueden fagocitar parásitos de talla pequeña como los mencionados anteriormente (Carlsen et al., 2013; Lima et al., 2018), estos leucocitos son incapaces de fagocitar a los trofozoítos, por el contrario, se han observado a trofozoítos fagocitando neutrófilos (Ávila et al., 2016). Los neutrófilos probablemente detectan el tamaño de los patógenos a través de la señalización vía dectina-1, lo cual les permite decidir entre la realización de fagocitosis o la liberación de NET por el secuestro de la NE (Branzk et al., 2014). En este sentido, durante la fagocitosis la NE se lleva al fagolisosoma, mientras que en la NETosis, esta proteasa se libera al citoplasma y posteriormente al núcleo para favorecer la descondensación del DNA. Esto correlaciona con observaciones previas en las que se ha visto que la NE se transloca al núcleo durante la interacción neutrófilo-trofozoíto (Díaz-Godínez et al., 2018).

Los mecanismos que conducen a la liberación de NET generalmente se incluyen en dos grupos: dependientes de NOX2 e independientes de NOX2. Fuchs et al.

(2007) fueron los primeros en reportar que la inhibición de NOX2 inhibía la NETosis usando PMA como estímulo, y diferentes autores han descrito el mismo efecto utilizando otros estímulos (Johnson et al., 2017; Khan et al., 2018). Posteriormente, se describió que los ionóforos de calcio también provocan NETosis, pero sin la participación de NOX2 (Wang et al., 2009). Anteriormente se ha reportado que los trofozoítos de *E. histolytica* provocan NETosis de forma independiente de NOX2 y PAD4, pues los inhibidores apocinina y GSK484 fallaron al inhibir o reducir la cantidad de DNA liberado. Incluso, se ha descrito que proporciones de 1 trofozoíto por cada 20 neutrófilos son capaces de suprimir completamente el estallido respiratorio de los neutrófilos (Díaz-Godínez et al., 2018; Fonseca et al., 2018). De forma interesante, en este trabajo se apreció que cantidades menores de trofozoítos (proporciones 1:50 y 1:100) reducen la producción de ROS en los neutrófilos sin inhibirla completamente. De acuerdo con Zhou et al. (2018), una desregulación en la entrada de calcio en los neutrófilos provoca que PAD4 citruline las unidades citoplasmáticas p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> de NOX2, bloqueando su ensamblaje y en última instancia impidiendo la generación de ROS. En este contexto, previamente se ha reportado que los trofozoítos inducen la entrada de calcio (Fonseca et al., 2018) y la citrulinación de proteínas (Díaz Godínez et al., 2018) en neutrófilos humanos, lo cual puede ocasionar la inactivación de NOX2 observada en las proporciones 1:20. Sin embargo, cuando una menor cantidad de trofozoítos interacciona con los neutrófilos es posible que no se lleve a cabo la citrulinación de todas las subunidades citoplasmáticas y por ello no se completa la inhibición, pero futuros estudios son necesarios para corroborar esta teoría.

Anteriormente se ha reportado que los trofozoítos muertos son incapaces de inducir NETosis (Ávila et al., 2016, Fonseca et al., 2018), lo cual se confirmó en este trabajo. Estos datos sugieren que algún producto de *E. histolytica* que solo se genera cuando se encuentra viable es necesario para inducir NET. En este sentido, las ROS generadas por algunos patógenos se han identificado como moléculas inductoras de NETosis, independientemente de las ROS generadas por el neutrófilo (Kenny et al., 2017; Díaz-Godínez et al., 2020). En concordancia con

esto, nuestro grupo describió que *Entamoeba dispar*, una amiba no patógena emparentada estrechamente con *E. histolytica*, no induce la liberación de NET y, además, no produce ROS (Fonseca et al., 2020; Díaz-Godínez et al., 2020). Como la mayoría de los estudios sugieren que todo mecanismo de NETosis es precedido por la generación de ROS, en este trabajo se decidió explorar la posibilidad de que las ROS generadas por los trofozoítos fueran el estímulo desencadenante. Aquí se verificó que los trofozoítos viables generan una cantidad basal de ROS, confirmando observaciones previas (Ramos-Marínez et al., 2009), mientras que los trofozoítos muertos por calor o fijados con formaldehído contiene una escasa cantidad de ROS. Aunque la muerte celular se asocia con la generación de ROS (Ghosh et al., 2010), las pequeñas cantidades detectadas pueden explicarse debido a que los estímulos usados causan inactivación (desnaturalización o entrecruzamiento) de las enzimas necesarias para su formación.

El pretratamiento de los trofozoítos con pirocatecol, un pepenador de peróxido de hidrógeno y radicales libres (Bendary et al., 2013; Nagarajan et al., 2020), redujo las ROS detectado en los trofozoítos viables. El peróxido de hidrógeno, una ROS de particular importancia en la NETosis, se genera por los trofozoítos como una respuesta de detoxificación del oxígeno molecular a través de diversas enzimas como la NADPH:flavina oxidorreductasa (Eh43), tiorredoxina reductasa (TrxR), oxidorreductasa dependiente de NADPH (NO1/2) o la Fe-superóxido dismutasa (FeSOD) (Ramos-Martínez et al., 2009; Olivos-García et al., 2016). La disminución de ROS en los trofozoítos por el pretratamiento con pirocatecol impactó directamente en la NETosis pues se detectó una menor cantidad de DNA extracelular. Además, la NETosis se inhibió por completo cuando se usaron trofozoítos pretratadas con el pepenador en proporciones menores (1:100 y 1:50). En concordancia con lo anterior, el pirocatecol inhibió completamente la liberación de NET inducida por PMA, la cual depende de peróxido de hidrógeno producido por los neutrófilos.

Kenny et al. (2017) propusieron que el peróxido de hidrógeno producido por *Candida albicans* era capaz de llevar a los neutrófilos a la NETosis, lo cual se

comprobó al utilizar pirocatecol como pepenador de peróxido de hidrógeno e inhibirse la NETosis inducida por este hongo. Sin embargo, la adición de catalasa (que posee alta especificidad por el peróxido de hidrógeno) falló en la inhibición de la NETosis inducida por el trofozoíto, contrastando con la inhibición parcial que se observó al utilizar el PMA como estímulo (Díaz-Godínez et al., 2021), lo cual se reportó también con anterioridad (Fuchs et al., 2007; Vorobjeva et al., 2020). Por ello, se abordó la participación de la MPO en el proceso debido a que se ha relacionado con otros mecanismos de NETosis (Kirchner et al., 2012), principalmente con estímulos no fagocitables como lo es el trofozoíto (Parker et al., 2012A, Parker et al., 2012B). Aquí se observó que los trofozoítos promueven la actividad de MPO después de ponerse en contacto con los neutrófilos, denotado por un incremento en la cantidad de luz detectada. Es importante notar que la señal máxima de la actividad de MPO se detectó al mismo tiempo que inicia la liberación del DNA sugiriendo que puede ser la señal que inicia el proceso. Además, los trofozoítos no presentaron actividad de MPO detectable al estar solas en cultivo, por lo que se puede asegurar que la señal detectada corresponde a la MPO derivada de los neutrófilos. Este dato se confirmó al utilizar la propiedad del luminol para funcionar como un pepenador de HClO (Björnsdottir et al., 2015). El luminol redujo la liberación de NET en todas las concentraciones probadas (50, 100 y 200  $\mu$ M) y el pretratamiento de los trofozoítos con este compuesto mostró resultados similares, sin embargo, el luminol incrementó las ROS generadas por los trofozoítos. Estos datos indican que la disminución de la NETosis está relacionada con la disminución de HClO y no con la disminución de otras ROS presentes en el trofozoíto. Es interesante notar que el luminol no afectó la NETosis inducida en una proporción trofozoíto:neutrófilo de 1:100, lo cual puede sugerir la existencia de diversos mecanismos para inducir la NETosis de acuerdo con las condiciones de estudio abordadas, lo cual se ha observado con otros patógenos como *Leishmania amazonensis* y *Candida glabrata* (Rochael et al., 2015; Johnson et al., 2017).

En este trabajo también exploramos el papel de las ROS mitocondriales (mitROS) en la NETosis inducida por el trofozoíto. Douda et al. (2015) describieron que las

mitROS se requieren en la NETosis inducida por los ionóforos de calcio ionomicina y A23187, lo cual ha sido replicado en otro trabajo (de Sousa et al., 2015). Otros estímulos biológicos como formas parasitarias de *Leishmania* o luz ultravioleta también requieren la presencia de mitROS (Rochael et al., 2015; Azzouz et al., 2018). En el presente trabajo se observó por primera vez que los trofozoítos de *E. histolytica* inducen la producción de mitROS sobre los neutrófilos humanos de una forma dosis dependiente. El mecanismo por el cual ocurre esto es desconocido, pero se propone que el reconocimiento del lipopeptidofosfoglicano (LPPG) del trofozoíto vía TLR2 y TLR4, así como la entrada descontrolada de calcio generada por los trofozoítos pudiera estar involucrada como se ha explorado por otros autores (Brookes et al., 2004). A pesar de la detección de mitROS durante la NETosis, el uso de mitoTEMPO como pepenador de estas moléculas falló en inhibir el proceso, lo cual sugiere que las mitROS no están relacionadas. Esto concuerda, además, con el hecho de que el DNP reduce la producción de NET, pero no por la disminución de mitROS, sino por la disminución de ROS en los trofozoítos (similar al pirocatecol).

Las observaciones por inmunofluorescencia mostraron que el DNA liberado por los neutrófilos durante la NETosis inducida por el trofozoíto se agrega como NET nubosas de acuerdo con una clasificación previa (Daniel et al., 2019). El DNA cubrió extensas áreas atrapando a los trofozoítos. Las NET observadas difieren con las observadas en otros estudios (Kaplan et al., 2012; Davidsson et al., 2020; Manda-Handzlik et al., 2020) pues la distribución de MPO y NE fue heterogénea, es decir, estos marcadores no colocalizaron completamente con el DNA, en contraste las proteínas se observaron como puntos localizados en áreas reducidas, sugiriendo que estas enzimas puedan liberarse por desgranulación previo o al mismo tiempo en el que ocurre la NETosis. Esto ayudaría a explicar el por qué hay una escases de estas proteínas en las NET.

La unión de MPO a los trofozoítos de *E. histolytica* se describió previamente por Pacheco-Yépez et al. (Pacheco-Yépez et al., 2011) quienes indicaron que la MPO purificada interacciona con los trofozoítos produciendo cambios morfológicos y

pérdida de su viabilidad, lo cual se observó también en los trofozoítos atrapados en las NET (Fonseca et al., 2019). Aquí se observó que la MPO se transfiere desde los neutrófilos hacia los trofozoítos en tiempos tempranos de interacción (5 y 10 min) lo cual sugiere un origen exógeno del HClO detectado anteriormente. En el presente trabajo se usó el isoluminol, un isómero hidrofóbico del luminol, para pepear el ácido hipocloroso extracelular (Jancinová et al., 2006). Los resultados muestran que el isolumino, redujo la liberación de NET en forma similar al luminol, indicando que la actividad extracelular de MPO es la responsable de la NETosis. Esta observación concuerda con trabajos anteriores que sustentan que el HClO o el ion hipoclorito son suficientes para llevar a los neutrófilos a NETosis.

Las EV representan un grupo heterogéneo de cuerpos membranosos producidos por prácticamente todos los seres vivos, desde bacterias hasta humanos (Bose et al., 2021; Simon et al., 2018; Rizzo et al., 2020; Liu et al., 2021). Actualmente, se acepta la existencia de tres tipos de vesículas extracelulares (EV) según sus características de tamaño, carga y ruta de secreción: exosomas (30-150 nm), microvesículas (100 nm hasta 1  $\mu$ m) y cuerpos apoptóticos (500 nm hasta > 5  $\mu$ m) (Doyle y Wang, 2019). El contenido de las EV incluye una amplia diversidad de proteínas, diferentes tipos de RNA (mRNA, tRNA, siRNA, lncRNAs), DNA e incluso organelos completos (Doyle y Wang, 2019; Veziroglu y Mías, 2020; Yokoi y Ochiya, 2021). Además, poseen moléculas de superficie que también les proporcionan propiedades funcionales (Burello et al., 2021). Las EV son elementos importantes de la comunicación celular ya que median funciones complejas como crecimiento y proliferación celular, diferenciación, respuesta a estímulos, inmunomodulación, e incluso procesos patológicos (Veerman et al., 2019; Zhao et al., 2021; Hanayama, 2021). Un informe previo sobre las EV de trofozoítos mostró que estas estructuras se liberan durante el enquistamiento de los trofozoítos de *Entamoeba invadens* y pueden promover el enquistamiento de otros trofozoítos, lo que sugiere que los trofozoítos pueden transferir información utilizando sus EV (Sharma et al., 2020). Aquí verificamos que los trofozoítos liberan EV mediante su caracterización por tamaño, composición lipídica y morfología, sugiriendo que pueden tratarse de exosomas o microvesículas, sin embargo, se necesita de la

identificación de marcadores específicos para garantizar el tipo de EV que libera este parásito bajo nuestras condiciones de cultivo. Adicionalmente, observamos que estas EV transportan ROS en su cargo, y que pueden incorporarse en neutrófilos humanos transfiriendo estas ROS, pudiendo ser el estímulo necesario para disparar la NETosis en estos leucocitos. Estas observaciones requieren de experimentos complementarios que permitan esclarecer contundentemente que tipo de ROS está presente en las EV, o bien, que otros mecanismos son empleados por los trofozoítos para que se lleve a cabo la transferencia de ROS.

## **9. CONCLUSIÓN**

Los resultados obtenidos sugieren que la NETosis desencadenada por los trofozoítos de *E. histolytica* ocurre de forma independiente de las ROS generadas en el interior del neutrófilo, debido a que este parásito es capaz de inhibir el estallido respiratorio de estos leucocitos sin que la NETosis se vea disminuida. Además, este mecanismo de liberación de NET depende las ROS generadas por los trofozoítos puesto que los trofozoítos deficientes en ROS son menos eficientes para inducir la NETosis y estos ROS pueden transferirse a través de vesículas extracelulares. Los datos también apuntan a que la MPO de los neutrófilos se transfiere de forma temprana a los trofozoítos (probablemente a su superficie) en donde las ROS del trofozoíto, transportadas en EV, se procesan de forma extracelular por esta enzima, generando probablemente HClO, el cual una vez dentro de los neutrófilos lleva a la liberación de las NET. También resulta importante mencionar que este mecanismo de NETosis es diferente a otros que ocurren de forma independiente de la actividad de NOX2, puesto que las ROS de origen mitocondrial no participan en la liberación de DNA. Estos hallazgos nos brindan una mayor aproximación para entender la interacción del neutrófilo con el trofozoíto y las implicaciones que estos eventos tiene en la prevalencia o eliminación de los trofozoítos durante la infección.

## 10. PERSPECTIVAS

El análisis de los datos obtenidos en el presente trabajo permite proponer algunos experimentos futuros que confirmen las propuestas realizadas. Entre ellos podemos mencionar:

- Determinar de forma específica la o las ROS producidas por los trofozoítos.
- Obtener trofozoítos mutantes que sean deficientes en la producción de ROS (similar a *Entamoeba dispar*) y observar su efectividad para inducir la NETosis.
- Determinar si existen diferentes mecanismos de liberación de NET dependiendo de la proporción trofozoíto:neutrófilo empleada.
- Determinar si existen otros mecanismos de transferencia de ROS además de las EV.
- Explorar la participación de las especies reactivas del nitrógeno en este proceso de NETosis.
- Verificar la participación de las ROS mitocondriales en este proceso de NETosis comprobando que el pepenador MitoTEMPO™ penetra en las células y que es efectivo para pepenar ROS mitocondriales al enfrentarlo con un estímulo que las produzca como el A23187.
- Verificar la entrada del MitoSOXRed® en los neutrófilos humanos mediante microscopía de fluorescencia.

## 11. REFERENCIAS

Abdallah, D. S. A., Lin, C., Ball, C. J., King, M. R., Duhamel, G. E., & Denkers, E. Y. (2012). Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infection and Immunity*, 80(2), 768–777. <https://doi.org/10.1128/IAI.05730-11>

Akong-Moore, K., Chow, O. A., von Köckritz-Blickwede, M., & Nizet, V. (2012). Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation. *PLoS ONE*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042984>

Alemán, O. R., Mora, N., Cortes-Vieyra, R., Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2016). Differential Use of Human Neutrophil Fc  $\gamma$  Receptors for Inducing Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Journal of Immunology Research*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2908034>

Asgharpour, A., Gilchrist, C., Baba, D., Hamano, S., & Houpt, E. (2005). Resistance to intestinal Entamoeba histolytica infection is conferred by innate immunity and Gr-1+ cells. *Infection and Immunity*, 73(8), 4522–4529. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.8.4522-4529.2005>

Ávila, E. E., Salaiza, N., Pulido, J., Rodríguez, M. C., Díaz-Godínez, C., Laclette, J. P., Becker, I., & Carrero, J. C. (2016). Entamoeba histolytica trophozoites and lipopeptidophosphoglycan trigger human neutrophil extracellular traps. *PLoS ONE*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158979>

Azzouz, D., Khan, M. A., Swezey, N., & Palaniyar, N. (2018). Two-in-one: UV radiation simultaneously induces apoptosis and NETosis. *Cell Death Discovery*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0048-3>

Beiter, K., Wartha, F., Albiger, B., Normark, S., Zychlinsky, A., & Henriques-Normark, B. (2006). An endonuclease allows Streptococcus pneumoniae to escape from neutrophil extracellular traps. *Current Biology*, 16(4), 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.056>

Bendary, E., Francis, R. R., Ali, H. M. G., Sarwat, M. I., & el Hady, S. (2013). Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(2), 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2013.07.002>

Bianchi, M., Hakkim, A., Brinkmann, V., Siler, U., Seger, R. A., Zychlinsky, A., & Reichenbach, J. (2009). Restoration of NET formation by gene therapy in CGD

controls aspergillosis. *Blood*, 114(13), 2619–2622. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-221606>

Björnsdóttir, H., Welin, A., Michaëlsson, E., Osla, V., Berg, S., Christenson, K., Sundqvist, M., Dahlgren, C., Karlsson, A., & Bylund, J. (2015). Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 89(1), 1024–1035. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.398>

Bose, S., Aggarwal, S., Singh, D. V., & Acharya, N. (2021). Extracellular vesicles: An emerging platform in gram-positive bacteria. *Microbial Cell*, 7(12), 312–322. Shared Science Publishers OG. <https://doi.org/10.15698/MIC2020.12.737>

Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S. E., Wang, Q., Gutierrez, M. G., Brown, G. D., & Papayannopoulos, V. (2014). Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nature Immunology*, 15(11), 1017–1025. <https://doi.org/10.1038/ni.2987>

Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *Journal of Cell Biology*, 198(5), 773–783. <https://doi.org/10.1083/jcb.201203170>

Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., & Sheu, S. S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: A mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 287(4), 56–4. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00139.2004>

Burn, G. L., Foti, A., Marsman, G., Patel, D. F., & Zychlinsky, A. (2021). The Neutrophil. *Immunity*, 54(7), 1377–1391. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.06.006>

Burrello, J., Tetti, M., Forestiero, V., Biemmi, V., Bolis, S., Pomatto, M. A. C., Amongero, M., di Silvestre, D., Mauri, P., Vassalli, G., Camussi, G., Williams, T. A., Mulatero, P., Barile, L., & Monticone, S. (2021). Characterization of circulating extracellular vesicle surface antigens in patients with primary aldosteronism. *Hypertension*, 726–737. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17136>

Cadenas S. (2018). Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochimica et biophysica acta. Bioenergetics*, 1859(9), 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.05.019>

Cacciotto, C., Cubeddu, T., Addis, M. F., Anfossi, A. G., Tedde, V., Tore, G., Carta, T., Rocca, S., Chessa, B., Pittau, M., & Alberti, A. (2016). Mycoplasma lipoproteins are major determinants of neutrophil extracellular trap formation. *Cellular Microbiology*, 18(12), 1751–1762. <https://doi.org/10.1111/cmi.12613>

Campos-Rodríguez, R., Gutiérrez-Meza, M., Jarillo-Luna, R. A., Drago-Serrano, M. E., Abarca-Rojano, E., Ventura-Juárez, J., Cárdenas-Jaramillo, L. M., & Pacheco-Yepez, J. (2016). A review of the proposed role of neutrophils in rodent amebic liver abscess models. *Parasite* 23(1). <https://doi.org/10.1051/parasite/2016006>

Carlsen, E. D., Hay, C., Henard, C. A., Popov, V., Garg, N. J., & Soong, L. (2013). Leishmania amazonensis amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. *Infection and Immunity*, 81(11), 3966–3974. <https://doi.org/10.1128/IAI.00770-13>

Carrero, J. C., Diaz, M. Y., Viveros, M., Espinoza, B., Acosta, E., & Ortiz-Ortiz, L. (1994). Human secretory immunoglobulin a anti-Entamoeba histolytica antibodies inhibit adherence of amebae to MDCK cells. *Infection and Immunity*, 62(2), 764–7. <https://doi.org/10.1128/iai.62.2.764-767.1994>.

Carrero, J. C., Reyes-López, M., Serrano-Luna, J., Shibayama, M., Unzueta, J., León-Sicairos, N., & de la Garza, M. (2020). Intestinal amoebiasis: 160 years of its first detection and still remains as a health problem in developing countries. In *International Journal of Medical Microbiology*, 310(1). <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151358>

Carvalho, L., Breda, D., Naffah De Souza Breda, C., Fogaça De Almeida, J. R., Neves, L., Paulo, M., Pereira Jannuzzi, G., de Godoy Menezes, I., Chaves Albuquerque, R., Olsen, N., Câmara, S., Ferreira, K. S., & Rogério De Almeida, S. (n.d.). *Fonsecaea pedrosoi* conidia and hyphae activate neutrophils distinctly: Requirement of TLR-2 and TLR-4 in neutrophil effector functions. <https://doi.org/10.1101/2020.01.06.895706>

Cedergren, J., Follin, P., Forslund, T., Lindmark, M., Sundqvist, T., & Skogh, T. (2003). Inducible nitric oxide synthase (NOS II) is constitutive in human neutrophils. *APMIS*, 111, 963–971.

Cheng, C., Trzcinski, O., & Doering, L. C. (2014). Fluorescent labeling of dendritic spines in cell cultures with the carbocyanine dye "Dil". *Frontiers in neuroanatomy*, 8, 30. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00030>

Cornick, S., & Chadee, K. (2017). Entamoeba histolytica: Host parasite interactions at the colonic epithelium. *Tissue Barriers*, 5(1). <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1283386>

Dallegri, F., Frumento, G., Patrone, F., & Dallegri, F. (1983). Mechanisms of tumour cell destruction by PMA-activated human neutrophils. *Immunology*, 48(2) 273-9.

Dallegri, F., Ballestrero, A., Frumento, G., Patrone, F., & Dallegri, F. (1985). Erythrocyte lysis by PMA-triggered neutrophil polymorphonuclears: evidence for an hypochlorous acid-dependent process. *Immunology*, 55(4), 639-45.

Daniel, C., Leppkes, M., Muñoz, L. E., Schley, G., Schett, G., & Herrmann, M. (2019). Extracellular DNA traps in inflammation, injury and healing. *Nature Reviews Nephrology*, 15(9), 559–575). <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0163-2>

Davidsson, L., Rudin, A. D., Klose, F. P. S., Buck, A., Björkman, L., Christenson, K., & Bylund, J. (2020). In vivo transmigrated human neutrophils are highly primed for intracellular radical production induced by monosodium urate crystals. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11). <https://doi.org/10.3390/ijms21113750>

de Souza, C. N., Breda, L. C. D., Khan, M. A., de Almeida, S. R., Câmara, N. O. S., Swezey, N., & Palaniyar, N. (2018). Alkaline pH promotes NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation: A matter of mitochondrial reactive oxygen species generation and citrullination and cleavage of histone. *Frontiers in Immunology*, 8(1). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01849>

Deloer, S., Nakamura, R., Kikuchi, M., Moriyasu, T., Kalenda, Y. D. J., Mohammed, E. S., Senba, M., Iwakura, Y., Yoshida, H., & Hamano, S. (2017). IL-17A contributes to reducing IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio and persistence of Entamoeba histolytica during intestinal amebiasis. *Parasitology International*, 66(6), 817–823. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.09.011>

Denis, M., & Chadee, K. (1989). Human neutrophils activated by interferon- $\gamma$  and tumour necrosis factor- $\alpha$  kill Entamoeba histolytica trophozoites in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*, 46(3), 270–274. <https://doi.org/10.1002/jlb.46.3.270>

Díaz-Godínez, C., Fonseca, Z., Néquiz, M., Lacleste, J. P., Rosales, C., & Carrero, J. C. (2018). Entamoeba histolytica trophozoites induce a rapid non-classical NETosis mechanism independent of NOX2-derived reactive oxygen species and

PAD4 activity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(1). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00184>

Díaz-Godínez, C., Martínez-Flores, A., Argüello-García, R., Olivos-García, A., Néquiz-Avedaño, M., Carrero, J.C. (2020). Role of Extracellular Traps Promoted by Intestinal Parasites. Relationship with Virulence. In: Guillen, N. (eds) *Eukaryome Impact on Human Intestine Homeostasis and Mucosal Immunology*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-44826-4\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-44826-4_13)

Douda, D. N., Khan, M. A., Grasemann, H., & Palaniyar, N. (2015). SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(9), 2817–2822. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414055112>

Doyle, L. M., & Wang, M. Z. (2019). Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*, 8(7), 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>

Fiedler, K., & Brunner, C. (2012). Mechanisms controlling hematopoiesis. *Hematology - Science and Practice*. InTech. <https://doi.org/10.5772/33749>

Fonseca, Z., Díaz-Godínez, C., Mora, N., Alemán, O. R., Uribe-Querol, E., Carrero, J. C., & Rosales, C. (2018). *Entamoeba histolytica* induce signaling via Raf/MEK/ERK for neutrophil extracellular trap (NET) formation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00226>

Fonseca, Z., Uribe-Querol, E., Díaz-Godínez, C., Carrero, J. C., & Rosales, C. (2019). Pathogenic *Entamoeba histolytica*, but not *Entamoeba dispar*, induce neutrophil extracellular trap (NET) formation. *Journal of Leukocyte Biology*, 105(6), 1167–1181. <https://doi.org/10.1002/JLB.MA0818-309RRR>

Fuchs, T. A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 176(2), 231–241. <https://doi.org/10.1083/jcb.200606027>

Funchal, G. A., Jaeger, N., Czepielewski, R. S., Machado, M. S., Muraro, S. P., Stein, R. T., Bonorino, C. B. C., & Porto, B. N. (2015). Respiratory syncytial virus fusion protein promotes TLR-4-dependent neutrophil extracellular trap formation by human neutrophils. *PLoS ONE*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124082>

García-García, E., Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2013). A simple and efficient method to detect nuclear factor activation in human neutrophils by flow cytometry. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 74. <https://doi.org/10.3791/50410>

Ghosh, A. S., Dutta, S., & Raha, S. (2010). Hydrogen peroxide-induced apoptosis-like cell death in *Entamoeba histolytica*. *Parasitology International*, 59(2), 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.01.001>

Gross, S., Gammon, S. T., Moss, B. L., Rauch, D., Harding, J., Heinecke, J. W., Ratner, L., & Piwnica-Worms, D. (2009). Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo. *Nature Medicine*, 15(4), 455–461. <https://doi.org/10.1038/nm.1886>

Guimarães-Costa, A. B., Nascimento, M. T. C., Froment, G. S., Soares, R. P. P., Morgado, F. N., Tima Conceição-O-Silva, F., & Saraiva, E. M. (2009). *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(16), 6748–6753. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900226106>

Guo, X., Barroso, L., Lysterly, D. M., Petri, W. A., & Houpt, E. R. (2011). CD4+ and CD8+ T cell- and IL-17-mediated protection against *Entamoeba histolytica* induced by a recombinant vaccine. *Vaccine*, 29(4), 772–777. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.11.013>

Guo, X., Stroup, S. E., & Houpt, E. R. (2008). Persistence of *Entamoeba histolytica* infection in CBA mice owes to intestinal IL-4 production and inhibition of protective IFN- $\gamma$ . *Mucosal Immunology*, 1(2), 139–146. <https://doi.org/10.1038/mi.2007.18>

Halverson, T. W. R., Wilton, M., Poon, K. K. H., Petri, B., & Lewenza, S. (2015). DNA Is an Antimicrobial Component of Neutrophil Extracellular Traps. *PLoS Pathogens*, 11(1), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004593>

Hanayama, R. (2021). Emerging roles of extracellular vesicles in physiology and disease. *Journal of Biochemistry*, 169(2), 135–138. <https://doi.org/10.1093/jb/mvaa138>

Haque, R., Ali, I. M., Sack, R. B., Farr, B. M., Ramakrishnan, G., & Petri, W. A. (2001). Amebiasis and Mucosal IgA Antibody against the *Entamoeba histolytica* Adherence Lectin in Bangladeshi Children. *The Journal of infectious diseases*, 183(12), 1787–1793. <https://doi.org/10.1086/320740>

Jancinová, V., Drábiková, K., Nosál, R., Racková, L., Májeková, M., & Holománová, D. (2006). The combined luminol/isoluminol chemiluminescence

method for differentiating between extracellular and intracellular oxidant production by neutrophils. *Redox Report*, 11(3), 110–116. <https://doi.org/10.1179/135100006X116592>

Johnson, C. J., Kernien, J. F., Hoyer, A. R., & Nett, J. E. (2017). Mechanisms involved in the triggering of neutrophil extracellular traps (NETs) by *Candida glabrata* during planktonic and biofilm growth. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13588-6>

Juneau, R. A., Pang, B., Weimer, K. W. D., Armbruster, C. E., & Swords, W. E. (2011). Nontypeable *Haemophilus influenzae* initiates formation of neutrophil extracellular traps. *Infection and Immunity*, 79(1), 431–438. <https://doi.org/10.1128/IAI.00660-10>

Jung, M. K., & Mun, J. Y. (2018). Sample Preparation and Imaging of Exosomes by Transmission Electron Microscopy. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (131), 56482. <https://doi.org/10.3791/56482>

Kalyanaraman, B., Cheng, G., Hardy, M., Ouari, O., Bennett, B., & Zielonka, J. (2018). Teaching the basics of reactive oxygen species and their relevance to cancer biology: Mitochondrial reactive oxygen species detection, redox signaling, and targeted therapies. *Redox biology*, 15, 347–362. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.12.012>

Kaplan, M. J., & Radic, M. (2012). Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *The Journal of Immunology*, 189(6), 2689–2695. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201719>

Kenny, E. F., Herzig, A., Krüger, R., Muth, A., Mondal, S., Thompson, P. R., Brinkmann, V., von Bernuth, H., & Zychlinsky, A. (2017). Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *eLife*, 6, e24437. <https://doi.org/10.7554/eLife.24437>

Khan, M. A., Philip, L. M., Cheung, G., Vadakepeedika, S., Grasemann, H., Swezey, N., & Palaniyar, N. (2018). Regulating NETosis: Increasing pH promotes NADPH oxidase-dependent NETosis. *Frontiers in Medicine*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00019>

Kirchner, T., Müller, S., Klinger, M., Solbach, W., Laskay, T., & Behnen, M. (2012). The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil

extracellular traps. *Mediators of Inflammation*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/849136>

Konig, M. F., & Andrade, F. (2016). A critical reappraisal of neutrophil extracellular traps and NETosis mimics based on differential requirements for protein citrullination. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00461>

Lacy, P. (2006). Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, 2(3), 98–108. <https://doi.org/10.1186/1710-1492-2-3-98>

Lawrence, S. M., Corriden, R., & Nizet, V. (2018). The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 82(1). <https://doi.org/10.1128/mnbr.00057-17>

Lee, W. L., Harrison, R. E., & Grinstein, S. (2003). Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection*, 5(14), 1299–1306. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.014>

Li, T., Zhang, Z., Li, X., Dong, G., Zhang, M., Xu, Z., & Yang, J. (2020). Neutrophil Extracellular Traps: Signaling Properties and Disease Relevance. *Mediators of Inflammation*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/9254087>

Li, P., Li, M., Lindberg, M. R., Kennett, M. J., Xiong, N., & Wang, Y. (2010). PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *Journal of Experimental Medicine*, 207(9), 1853–1862. <https://doi.org/10.1084/jem.20100239>

Lima, T. S., Gov, L., & Lodoen, M. B. (2018). Evasion of human neutrophil-mediated host defense during *Toxoplasma gondii* infection. *MBio*, 9(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02027-17>

Liu, G., Kang, G., Wang, S., Huang, Y., & Cai, Q. (2021). Extracellular Vesicles: Emerging Players in Plant Defense Against Pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.757925>

Ma, F., Chang, X., Wang, G., Zhou, H., Ma, Z., Lin, H., & Fan, H. (2018). *Streptococcus Suis* Serotype 2 Stimulates Neutrophil Extracellular Traps Formation via Activation of p38 MAPK and ERK1/2. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02854>

Mailloux R. J. (2015). Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. *Redox biology*, 4, 381–398. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.02.001>

Maldonado-Bernal, C., Kirschning, C. J., Rosenstein, Y., Rocha, L. M., Rios-Sarabia, N., Espinosa-Cantellano, M., Becker, I., Estrada, I., Salazar-González, R. M., López-Macías, C., Wagner, H., Sánchez, J., & Isibasi, A. (2005). The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. *Parasite immunology*, 27(4), 127–137. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00754.x>

Malengier-Devlies, B., Metzemaekers, M., Wouters, C., Proost, P., & Matthys, P. (2021). Neutrophil Homeostasis and Emergency Granulopoiesis: The Example of Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.766620>

Manda-Handzlik, A., Bystrzycka, W., Cieloch, A., Glodkowska-Mrowka, E., Jankowska-Steifer, E., Heropolitanska-Pliszka, E., Skrobot, A., Muchowicz, A., Ciepiela, O., Wachowska, M., & Demkow, U. (2020). Nitric oxide and peroxynitrite trigger and enhance release of neutrophil extracellular traps. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(15), 3059–3075. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03331-x>

Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., & Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 11(8), 519–531. <https://doi.org/10.1038/nri3024>

McCormick, A., Heesemann, L., Wagener, J., Marcos, V., Hartl, D., Loeffler, J., Heesemann, J., & Ebel, F. (2010). NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and Infection*, 12(12–13), 928–936. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.06.009>

McIlroy, D. J., Jarnicki, A. G., Au, G. G., Lott, N., Smith, D. W., Hansbro, P. M., & Balogh, Z. J. (2014). Mitochondrial DNA neutrophil extracellular traps are formed after trauma and subsequent surgery. *Journal of Critical Care*, 29(6), 1133.e1-1133.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2014.07.013>

McIlroy, D. J., Jarnicki, A. G., Au, G. G., Lott, N., Smith, D. W., Hansbro, P. M., & Balogh, Z. J. (2014). Mitochondrial DNA neutrophil extracellular traps are formed after trauma and subsequent surgery. *Journal of Critical Care*, 29(6), 1133.e1-1133.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2014.07.013>

Metzler, K. D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A., & Papayannopoulos, V. (2014). Myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Reports*, 8(3), 883–896. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.044>

Mutua, V., & Gershwin, L. J. (2021). A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 61(2), 194–211. <https://doi.org/10.1007/s12016-020-08804-7>

Murphy, M. P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C. J., Davies, K. J. A., Davies, M. J., Dick, T. P., Finkel, T., Forman, H. J., Janssen-Heininger, Y., Gems, D., Kagan, V. E., Kalyanaraman, B., Larsson, N. G., Milne, G. L., Nyström, T., Poulsen, H. E., Radi, R., Van Remmen, H., Schumacker, P. T., ... Halliwell, B. (2022). Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature metabolism*, 4(6), 651–662. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00591-z>

Nagarajan, S., Nagarajan, R., Kumar, J., Salemme, A., Togna, A. R., Saso, L., & Bruno, F. (2020). Antioxidant activity of synthetic polymers of phenolic compounds. *IPolymers*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/POLYM12081646>

Nakada-Tsukui, K., & Nozaki, T. (2016). Immune response of amebiasis and immune evasion by *Entamoeba histolytica*. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00175>

Neeli, I., & Radic, M. (2012). Knotting the NETs: Analyzing histone modifications in neutrophil extracellular traps. *Arthritis Research and Therapy*, 14(2). <https://doi.org/10.1186/ar3773>

Ng, N. S., & Ooi, L. (2021). A Simple Microplate Assay for Reactive Oxygen Species Generation and Rapid Cellular Protein Normalization. *Bio-protocol*, 11(1), e3877. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3877>

Olivos-García, A., Saavedra, E., Nequiz, M., Santos, F., Luis-García, E. R., Gudiño, M., & Pérez-Tamayo, R. (2016). The oxygen reduction pathway and heat shock stress response are both required for *Entamoeba histolytica* pathogenicity. *Current Genetics*, 62(2), 295–300. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0543-5>

Olivos-García, A., Carrero, J. C., Ramos, E., Nequiz, M., Tello, E., Montfort, I., & Pérez-Tamayo, R. (2007). Late experimental amebic liver abscess in hamster is inhibited by cyclosporine and N-acetylcysteine. *Experimental and Molecular Pathology*, 82(3), 310–315. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2006.09.005>

Ortiz-Castillo, F., Enrique Salinas-Aragón, L., Sánchez-Aguilar, M., Humberto Tapia-Pérez, J., Sánchez-Reyna, M., Pierdant-Pérez, M., Juan Sánchez-Rodríguez, J., & Francisco Hernández-Sierra, J. (2012). Amoebic toxic colitis: Analysis of factors related to mortality. *Pathogens and Global Health*, 106(4), 245–248. <https://doi.org/10.1179/2047773212Y.0000000019>

Pacheco-Yépez, J., Rivera-Aguilar, V., Barbosa-Cabrera, E., Rojas Hernández, S., Jarillo-Luna, R. A., & Campos-Rodríguez, R. (2011). Myeloperoxidase binds to and kills *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Parasite Immunology*, 33(5), 255–264. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01275.x>

Palmer, L. J., Cooper, P. R., Ling, M. R., Wright, H. J., Huissoon, A., & Chapple, I. L. C. (2012). Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. *Clinical and Experimental Immunology*, 167(2), 261–268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04518.x>

Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., & Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 191(3), 677–691. <https://doi.org/10.1083/jcb.201006052>

Parker, H., Albrett, A. M., Kettle, A. J., & Winterbourn, C. C. (2011). Myeloperoxidase associated with neutrophil extracellular traps is active and mediates bacterial killing in the presence of hydrogen peroxide. *Journal of Leukocyte Biology*, 91(3), 369–376. <https://doi.org/10.1189/jlb.0711387>

Parker, H., & Winterbourn, C. C. (2012). Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Frontiers in Immunology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00424>

Perron, N. R., & Brumaghim, J. L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell biochemistry and biophysics*, 53(2), 75–100. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9043-x>

Patel, S., Kumar, S., Jyoti, A., Srinag, B. S., Keshari, R. S., Saluja, R., Verma, A., Mitra, K., Barthwal, M. K., Krishnamurthy, H., Bajpai, V. K., & Dikshit, M. (2010). Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 22(3), 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2010.01.001>

Petretto, A., Bruschi, M., Pratesi, F., Croia, C., Candiano, G., Ghiggeri, G., & Migliorini, P. (2019). Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different

stimuli: A comparative proteomic analysis. *PLoS ONE*, 14(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218946>

Ramirez-Ricardo, J., Leal-Orta, E., Garcia-Hernandez, A., Diaz-Aragon, R., Cortes-Reynosa, P., Thompson-Bonilla, R., & Salazar, E. P. (2021). Role of Src/FAK in migration and invasion mediated by extracellular vesicles from MDA-MB-231 cells stimulated with linoleic acid. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 38(4), 40. <https://doi.org/10.1007/s12032-021-01485-y>

Ramos-Martínez, E., Olivos-García, A., Saavedra, E., Nequiz, M., Sánchez, E. C., Tello, E., El-Hafidi, M., Saralegui, A., Pineda, E., Delgado, J., Montfort, I., & Pérez-Tamayo, R. (2009). Entamoeba histolytica: Oxygen resistance and virulence. *International Journal for Parasitology*, 39(6), 693–702. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.11.004>

Rizzo, J., Rodrigues, M. L., & Janbon, G. (2020). Extracellular Vesicles in Fungi: Past, Present, and Future Perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00346>

Rochael, N. C., Guimarães-Costa, A. B., Nascimento, M. T. C., Desouza-Vieira, T. S., Oliveira, M. P., Garciae Souza, L. F., Oliveira, M. F., & Saraiva, E. M. (2015). Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by Leishmania parasites. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep18302>

Rohrbach, A. S., Slade, D. J., Thompson, P. R., & Mowen, K. A. (2012). Activation of PAD4 in NET formation. *Frontiers in Immunology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00360>

Rosales, C. (2018). Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Frontiers in Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>

Santos, H. J., & Nozaki, T. (2022). The mitosome of the anaerobic parasitic protist Entamoeba histolytica: A peculiar and minimalist mitochondrion-related organelle. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 69(6). <https://doi.org/10.1111/jeu.12923>

Seydel, K. B., & Stanley, S. L. (1998). Entamoeba histolytica induces host cell death in amebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor alpha-dependent pathway of apoptosis. *Infection and immunity*, 66(6), 2980–2983. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.6.2980-2983.1998>

Sharma, M., Morgado, P., Zhang, H., Ehrenkauf, G., Manna, D., & Singh, U. (2020). Characterization of extracellular vesicles from entamoeba histolytica

identifies roles in intercellular communication that regulates parasite growth and development. *Infection and Immunity*, 88(10). <https://doi.org/10.1128/IAI.00349-20>

Shibayama, M., Campos-Rodríguez, R., Ramírez-Rosales, A., Flores-Romo, L., Espinosa-Cantellano, M., Martínez-Palomo, A., & Tsutsumi, V. (1998). Entamoeba histolytica: liver invasion and abscess production by intraperitoneal inoculation of trophozoites in hamsters, Mesocricetus auratus. *Experimental parasitology*, 88(1), 20–27. <https://doi.org/10.1006/expr.1998.4218>

Shirley, D. A. T., Farr, L., Watanabe, K., & Moonah, S. (2018). A review of the global burden, new diagnostics, and current Therapeutics for amebiasis. *Open Forum Infectious Diseases*, 5(7). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy161>

Simon, C., Greening, D. W., Bolumar, D., Balaguer, N., Salamonsen, L. A., & Vilella, F. (2018). Extracellular vesicles in human reproduction in health and disease. *Endocrine Reviews*, 39(3), 292–332. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00229>

Sørensen, O. E., & Borregaard, N. (2016). Neutrophil extracellular traps - The dark side of neutrophils. *The Journal of clinical investigation*, 126(5), 1612–1620. <https://doi.org/10.1172/JCI84538>

Sousa-Rocha, D., Thomaz-Tobias, M., Diniz, L. F. A., Souza, P. S. S., Pinge-Filho, P., & Toledo, K. A. (2015). Trypanosoma cruzi and its soluble antigens induce NET release by stimulating toll-like receptors. *PLoS ONE*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139569>

Speziale, P., & Pietrocola, G. (2021). Staphylococcus aureus induces neutrophil extracellular traps (NETs) and neutralizes their bactericidal potential. *Computational and structural biotechnology journal*, 19, 3451–3457. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.06.012>

Stefanska, J., & Pawliczak, R. (2008). Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators of inflammation*, 2008, 106507. <https://doi.org/10.1155/2008/106507>

Steinberg, B. E., & Grinstein, S. (2007). Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2007(379). <https://doi.org/10.1126/stke.3792007pe11>

Stoiber, W., Obermayer, A., Steinbacher, P., & Krautgartner, W. D. (2015). The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans. *Biomolecules*, 5(2), 702–723. <https://doi.org/10.3390/biom5020702>

Tanyuksel, M., & Petri, W. A. (2003). Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4), 713–729. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.4.713-729.2003>

Tecchio, C., Micheletti, A., & Cassatella, M. A. (2014). Neutrophil-derived cytokines: Facts beyond expression. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00508>

Thibeaux, R., Weber, C., Hon, C. C., Dillies, M. A., Avé, P., Coppée, J. Y., Labruyère, E., & Guillén, N. (2013). Identification of the virulence landscape essential for *Entamoeba histolytica* invasion of the human colon. *PLoS Pathogens*, 9(12), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003824>

Tsan M. F. (1980). Phorbol myristate acetate induced neutrophil autotoxicity. *Journal of cellular physiology*, 105(2), 327–334. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041050215>

Tsutsumi, V., Mena-Lopez, R., Anaya-Velazquez, F., & Martinez-Palomo, A. (1984). Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *The American journal of pathology*, 117(1), 81–91.

Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* and hyphal forms. *Cellular Microbiology*, 8(4), 668–676. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x>

van der Veen, B. S., de Winther, M. P., & Heeringa, P. (2009). Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxidants & redox signaling*, 11(11), 2899–2937. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2538>

Veerman, R. E., Güçlüler Akpınar, G., Eldh, M., & Gabrielsson, S. (2019). Immune Cell-Derived Extracellular Vesicles - Functions and Therapeutic Applications. *Trends in molecular medicine*, 25(5), 382–394. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.02.003>

Veziroglu, E. M., & Mias, G. I. (2020). characterizing extracellular vesicles and their diverse RNA contents. *Frontiers in genetics*, 11, 700. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00700>

Vorobjeva, N. V., & Chernyak, B. V. (2020). NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochemistry. Biokhimiia*, 85(10), 1178–1190. <https://doi.org/10.1134/S0006297920100065>

Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S. A., Allis, C. D., & Coonrod, S. A. (2009). Histone

hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *Journal of Cell Biology*, 184(2), 205–213. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806072>

Yokoi, A., & Ochiya, T. (2021). Exosomes and extracellular vesicles: Rethinking the essential values in cancer biology. *Seminars in Cancer Biology*, 74, 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.03.032>

Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., & Simon, H. U. (2009). Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death and Differentiation*, 16(11), 1438–1444. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.96>

Zafar, S., Ahmed, R., & Khan, R. (2016). Biotransformation: a green and efficient way of antioxidant synthesis. *Free radical research*, 50(9), 939–948. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1209745>

Zhao, C., Deng, Y., He, Y., Huang, X., Wang, C., & Li, W. (2021). Decreased Level of Exosomal miR-5121 Released from microglia suppresses neurite outgrowth and synapse recovery of neurons following traumatic brain injury. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 18(2), 1273–1294. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00999-z>